

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

ESCUELA DE POST GRADO

Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. "red globe" cultivados en Perú

TESIS

**Para optar al Grado Académico de Magíster en Recursos Vegetales y
Terapéuticos**

AUTOR

Gianinna del Carmen Márquez Mendoza

ASESOR

César Fuertes Ruitón

Lima - Perú

2011

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	<i>Prunus domestica</i> L.	3
	Taxonomía	3
	Descripción botánica	4
	Propiedades biológicas	4
2.2	<i>Ficus carica</i> L.	4
	Taxonomía	4
	Descripción botánica	5
	Propiedades biológicas	5
2.3	<i>Vitis vinífera</i> L c.v. “Red Globe”.	5
	Taxonomía	5
	Descripción botánica	6
	Propiedades biológicas	7
2.4	Las frutas y el color	7
2.5	Compuestos fenólicos	8
2.6	Antocianinas	11
2.6.1	Generalidades	11
2.6.2	Estructura química	12
2.6.3	Biosíntesis	16
2.6.4	Distribución en la naturaleza	17
2.6.5	Estabilidad	18
2.6.6	Ensayos cromatográficos	20
2.6.7	Propiedades biológicas	20
2.7	Radicales libres	21
2.7.1	Producción de radicales libres de oxígeno	21
2.7.2	Reactividad de los radicales libres y estrés oxidativo	21
2.7.3	Daño molecular inducido por radicales libres	22

2.8	Antioxidantes	22
2.8.1	Niveles de acción antioxidante	23
III	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1	Lugar de ejecución	24
3.2	Materiales y reactivos	24
3.3	Muestra vegetal	24
	Muestra vegetal <i>Prunus domestica</i> L.	25
	Muestra vegetal <i>Ficus carica</i> L.	25
	Muestra vegetal <i>Vitis vinifera</i> L. c.v. “Red Globe”	25
3.4	Ensayos químicos	26
3.4.1	Índice de color	26
3.4.2	Extracción, purificación y aislamiento de las antocianinas para análisis por espectrofotometría.	26
3.4.3	Extracción, purificación, aislamiento e identificación de las antocianinas por cromatografía HPLC.	27
3.4.4	Identificación de los azúcares monosacáridos.	28
3.4.5	Cuantificación de las antocianinas monoméricas empleando el método de pH diferencial.	28
3.5	Ensayos biológicos	30
	Actividad antioxidante	30
IV	RESULTADOS	32
V	DISCUSIÓN	64
VI	CONCLUSIONES	67
VII	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	68
VIII	ANEXOS	73

DEDICATORIA

A Dios, por estar siempre a mi lado y llenar mi vida de dichas y bendiciones.

A la Virgen María porque me reconfortas con tu mirada.

A Juan Pablo II por cuidar mi hogar.

A mi Ángel de la Guarda, porque está conmigo hasta en los momentos mas difíciles.

A la memoria de mi Mamá Elsitita y mi Mamá Chelita, que me enseñaron a tener fé, rezar y ser fuerte

Salmo 23- 22 El Señor es mi pastor

El señor es mi pastor, nada me falta, por verdes prados El me hace reposar, y
donde brota agua fresca me conduce, fortalece mi alma por amor de tu
nombre. Aunque pase por quebradas muy oscuras yo no tengo miedo, tu
bastón y tu cayado me protegen. Me sirves a la mesa frente a mis adversarios,
con aceites perfumas mi cabeza y rellenas mi copa, mi templo será tu casa por
largo largo tiempo.

A mi papá, Víctor Juan que junto a mi madre me dieron el mejor hogar, lleno de amor, comprensión, felicidad, paz y seguridad; que hicieron de mi infancia, adolescencia y juventud, la más bella de todas.

A mis hermosos hermanos Juan, Miryam, Mariella y Alexis a quienes adoro; ustedes son mi inspiración, mi fortaleza y el mejor regalo que me dieron nuestros padres.

A mi hija Leslie Marianne, mi dulce niña, eres la luz que ilumina mi vida.

A Herbert, mi esposo, por hacer de cada día el mejor de todos.

A Violeta y a la memoria de Herbert, quienes sin ser mis padres me hicieron sentir su hija.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM que me abrió sus puertas en el pre y postgrado.

A mi querido Dr. Cesar Fuertes Ruitón, por brindarme su amistad, calidez y asesoría en todo momento.

A mis queridos padrinos de promoción Dra. Nancy Lozano, Dr. Pablo Bonilla y Dra. Elena Benavides, gracias por su amistad y estímulo.

A mi queridos doctores Miembros del Jurado, Dra. Gloria Gordillo y Dr. Luis Miguel Felix Veliz, gracias por su cariño, palabras de estímulo y por incrementar mi conocimiento en todo momento.

A mi querida Dra. Eva Ramos, gracias por su amistad, conocimiento y paciencia.

A mis amigos del Laboratorio de Química Orgánica: Melissa, Verónica, Gustavo, Betzy y Marielena por el inmenso apoyo que me brindaron y por la energía propia de la juventud que me transmitieron.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se realizó el estudio fitoquímico de los frutos rojos de las especies vegetales *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”, conocidas como ciruela, higo y uva “Red Globe”, respectivamente. Los frutos se recolectaron en el departamento de Lima e Ica entre los meses de noviembre 2010 a marzo 2011. Se inició el estudio con la selección y recolección de los frutos rojos de las tres especies. Luego de lavadas las muestras, se les determinó el índice de color (IC), encontrándose que la uva presentaba un IC de 177,22, la ciruela de 164,52 y el higo de 53,04. La extracción de las antocianinas se hizo empleando como solvente el metanol. Con el extracto metanólico se realizaron ensayos cromatográficos utilizando papel Whatman N° 3 y como fase móvil el BAW donde se encontró presencia de antocianinas. Las antocianinas se aislaron recortando las bandas coloreadas y eluyéndolas en 0,01% HCl en metanol, para luego ser leídas en el espectrofotómetro. Según la literatura, los resultados observados no son concluyentes, por lo que se los contrastó con HPLC. Los resultados iniciales arrojan presencia de cianidina en el higo, cianidina y peonidina en la ciruela; y cianidina, malvidina y peonidina en la uva. La cromatografía por HPLC advierte que en la muestra de higo se encuentran la cianidina 3-glucósido y cianidina 3-ramnoglucósido; en la muestra de ciruela la cianidina 3-xylósido, cianidina 3-glucósido, cianidina 3-rutinósido, peonidina 3-glucósido y peonidina 3-rutinósido; mientras que en la uva se encontró la delfinidina 3-glucósido, cianidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido. La cuantificación de las antocianinas monoméricas totales de los tres frutos mostró que hay mayor cantidad de antocianinas monoméricas (expresado en mg de cianidina 3-glucósido /100g) en la ciruela 39,92, seguido del higo 30,09 y la uva red globe 21,28. Asimismo, se determinó la actividad biológica de las antocianinas mediante la capacidad antioxidante de los frutos, encontrándose que la uva presenta una IC₅₀ (µg/mL) de 3,87, el higo una IC₅₀ (µg/mL) de 8,50 y la ciruela una IC₅₀ (µg/mL) de 13,25.

Palabras clave: *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L., *Vitis vinifera* L., antocianina, actividad antioxidante, índice de color, HPLC.

ABSTRACT

In this research work, the red fruits phytochemical study of the vegetal species *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. and *Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe", commonly known as prune, fig and "Red Globe" grape, respectively was made. These fruits were harvested in Lima and Ica departments since November 2010 to March 2011. The study starts with the tree red fruits species selection and harvest. After washing the fruits, the color index (CI) was set, found that grape had an 177,22 CI, prune 164,52 CI and fig 53,04 CI. The anthocyanins extraction was made using methanol as solvent. With the methanolic extract, chromatographic essays was made using Whatman N° 3 paper and BAW as mobile phase where anthocyanins presence was found. The anthocyanins were isolated cutting the colored bands eluting from these bands in 0,01% HCl in methanol, to be read in the spectrophotometer. According the literature, the observed results are not conclusive, therefore it was HPLC contrasted. The initial results show cyanidin presence in fig, cyanidin and peonidin in prune; and cyanidin, malvidin and peonidin in grape. The HPLC chromatography show that in the fig sample was found cyanidin 3-glucoside and cyanidin 3-rhamnoglucoside; in the prune sample the cyanidin 3-xylose, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-rutinoside, peonidin 3-glucoside and peonidin 3-rutinoside; as in the grape was found the delphinidin 3-glucoside, cyanidin 3-glucoside, petunidin 3-glucoside, peonidin 3-glucoside and malvidin 3-glucoside. The total monomeric anthocyanins quantification of the three fruits show that there are a bigger monomeric anthocyanins amount (enunciate in mg of cyanidin 3-glucoside/100g) in prune 39,92, followed by fig 30,09 and at last the red globe grape 21,28. Finally, it was determined the anthocyanin biological activity by means of fruits antioxidant capacity, found that the grape show a CI₅₀ (µg/mL) of 3,87, the fig a CI₅₀ (µg/mL) of 8,50 and the prune a CI₅₀ (µg/mL) of 13,25.

Keywords: *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L., *Vitis vinifera* L., anthocyanin, antioxidant activity, color index, HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

Los avances de la Química Orgánica y la Biología sumados al auge de los métodos espectroscópicos y espectrométricos han servido como herramientas para el desarrollo de la Investigación Científica Multidisciplinaria; sobre todo para el estudio de los principios activos de las plantas y su acción terapéutica.

Los metabolitos secundarios de las plantas constituyen un gran potencial de utilidad para el hombre, la disciplina que la estudia es la Fitoquímica, que permite conocer los principios activos.

El área de la interacción alimentos-salud conocida como la de los “alimentos funcionales” acepta el papel de los componentes alimenticios, como elementos importantes para el mantenimiento de la vida y la salud; y como compuestos no nutricionales que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas de la edad madura.

El concepto tradicional de que para el mantenimiento de una salud óptima la dieta diaria debe proveer cantidades adecuadas de nutrientes esenciales ha cambiado en los últimos años, por la evidencia cada vez mas fuerte de que como una mezcla compleja de sustancias químicas, los alimentos contienen también sustancias fisiológicamente activas que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función de beneficio contribuyendo a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas y por tanto son necesarias para una vida saludable. Excepto por los nutrientes reconocidos, la mayoría de tales sustancias alimenticias permanecen sin ser completamente caracterizadas por sus funciones fisiológicas.

Los compuestos fenólicos aparecen como parte de esta amplia gama de alimentos funcionales, y en los últimos años se ha determinado su fuerte relación con la disminución de enfermedades crónicas, debido a su elevada actividad antioxidante.

La contribución de los compuestos fenólicos a la pigmentación de los alimentos vegetales está claramente reconocida a través de las antocianinas, responsables de los colores rojo, azul, violeta, naranja y púrpura de la mayoría de los vegetales, entre ellas las frutas.

La presente investigación se ha realizado en las especies vegetales ***Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”**, conocidas comúnmente como ciruela, higo y uva Red Globe, respectivamente, las cuales poseen una gran cantidad de metabolitos primarios y secundarios, entre ellos las antocianinas. Los metabolitos le permiten a la planta crecer, multiplicarse, defenderse y sobrevivir, evidenciándose su actividad antioxidante

II. MARCO TEORICO

2.1. *Prunus domestica* L.

Taxonomía

Clasificación sistemática

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL), según el Sistema de Clasificación de Cronquist y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III). Como sigue:

Sistemática del “ciruelo” de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Rosales
Familia	: Rosaceae
Subfamilia	: Prunoideae
Género	: <i>Prunus</i>
Especie	: <i>Prunus domestica</i> L.
Nombre vulgar: Ciruela	

Sistemática del “ciruelo” de acuerdo a APG III (2009)

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Eudicotiledóneas
Clado	: Rósidas
Orden	: Rosales
Familia	: Rosaceae
Subfamilia	: Prunoideae
Género	: <i>Prunus</i>
Especie	: <i>Prunus domestica</i> L. (Anexo 1)

Descripción botánica

***Prunus domestica* L.** es un árbol caducifolio e inerte de hasta 10m. Las hojas van en disposición alterna o formando haces en los brotes cortos, son simples, de forma elíptica, con peciolo corto y margen festoneado. Las flores van provistas de largos cabillos, solitarias o en ramilletes. Son de color blanco o blanco verdoso y tienen cinco pétalos ovalados, libres de 7 a 15mm; estambres numerosos, insertos en varias filas junto a los pétalos. El pistilo produce al madurar una drupa globosa o alargada de color que puede variar entre púrpura oscuro, rojo, verde o amarillento ⁽¹⁾.

Propiedades biológicas

El fruto de ***Prunus domestica* L.** es conocido por sus propiedades laxantes, siendo usado también como excipiente de otros medicamentos ⁽²⁾.

La bibliografía indica que dos cucharadas de jugo de ciruelas frescas alivian irritaciones bucales, úlceras en labios y aftas ⁽³⁾.

2.2. *Ficus carica* L.

Taxonomía

Clasificación sistemática

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL), según el Sistema de Clasificación de Cronquist y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III). Como sigue:

Sistemática de la “higuera” de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Hamamelidae
Orden	: Urticales
Familia	: Moraceae
Género	: <i>Ficus</i>
Especie	: <i>Ficus carica</i> L.
Nombre vulgar:	Higo

Sistemática de la “higuera” de acuerdo a APG III (2009)

Reino	: Plantae
División	: Angiospermas
Clase	: Eudicotiledóneas
Subclase	: Rosidas
Orden	: Rosales
Familia	: Moraceae
Género	: <i>Ficus</i>
Especie	: <i>Ficus carica</i> L.

Descripción botánica

Es una planta perenne, arbustiva, de 0,50 a 1 m de altura con agujones anaranjados, rojizos en el ápice y de 1 a 2 cm de largo distribuidos sobre los tallos y en las nervaduras de las hojas. Su raíz es gruesa, el tallo erecto, ramificado, anguloso, pubescente, con hojas alternas, pinnatífidas o pinnatisectas. Presenta una inflorescencia cimosa, terminal, con flores blancas, azules o liliáceas. El fruto es una baya anaranjada o rojiza de 10 – 12 mm de diámetro. Es una especie originaria de América del Sur ⁽⁴⁾.

Propiedades biológicas

Es jugo del higo es bactericida y favorece la digestión. Durante siglos los higos han sido recomendados para curar el cáncer, estreñimiento, hemorroides, gangrena, afecciones hepáticas, erupciones y para recobrar la energía y vitalidad ⁽⁵⁾.

2.3 *Vitis vinífera* L. c.v. “Red Globe”.

Taxonomía

Clasificación sistemática

La clasificación sistemática de la planta se realizó en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL), según el sistema de clasificación de Cronquist y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III). Como sigue:

Sistemática de la “vid”, ***Vitis vinifera* L.** de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Rhamnales.
Familia	: Vitaceae
Género	: <i>Vitis</i>
Especie	: <i>Vitis vinifera</i> L.
Cultivar	: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. ‘Red Globe’
Nombre vulgar	: Uva “Red Globe”

Sistemática de la “vid” de acuerdo a la APG III (2009)

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Eudicotiledóneas
Clado	: Rosidas
Familia	: Vitaceae
Género	: <i>Vitis</i>
Especie	: <i>Vitis vinifera</i> L.
Cultivar	: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. ‘Red Globe’

Descripción botánica

Arbusto trepador de ramas cilíndricas, volubles, con zarcillos opuestos a las hojas. Hojas lobuladas sinuosas, discretamente dentadas de color verde intenso o verde pálido. Flores pequeñas con un cáliz de cinco segmentos y cinco pétalos separados por la base y unidos por el extremo. Frutos denominados uvas casi esféricos y agrupados en racimos. Dichos frutos son bayas de color rojo con dos celdas y dos a cuatro semillas ⁽⁶⁾.

Propiedades biológicas

Se le atribuye propiedades desintoxicante, antiséptica y cicatrizante. Se recomienda contra la anemia, estados febriles, nefritis, artritis, reumatismo y gota. El mosto de uva sin fermentar es laxante. La uva es estimulante, digestiva y diurética ⁽⁷⁾.

2.4 Las frutas y el color

Las frutas son definidas por el Código Alimentario Español (CAE) como fruto, semilla, inflorescencia o partes carnosas de órganos florales que hayan alcanzado un grado adecuado de madurez y sean aptas para el consumo humano ⁽⁸⁾.

Desde el punto de vista nutricional las frutas carnosas aportan principalmente agua, minerales, vitaminas y fibra ^{(9) (10)}; están formadas en un 80 a 90% de agua, y el contenido en proteínas y lípidos en general es bajo. Salvo algunas excepciones, el aporte energético de las frutas no sobrepasan las 70 Kcal/100g, por lo que su consumo es útil en dietas de control de peso. Dentro de los micronutrientes, los hidratos de carbono son los componentes más abundantes, en particular, azúcares, almidones, celulosa, hemicelulosa y sustancias pépticas. La proporción de azúcares y demás hidratos de carbono es diferente entre una fruta y otra, e incluso dentro de la misma especie, según la variedad y el cultivo. Además, varía con el grado de maduración ya que el almidón desaparece a medida que la fruta madura, a la vez que se acumula el azúcar.

Asimismo este grupo de alimentos es rico en fibra, especialmente de tipo soluble, lo que se asocia con el efecto de saciedad, regulación de la motilidad gastrointestinal, reducción del colesterol, modificación en la absorción de grasas y disminución en la incidencia de cáncer de colon.

En las frutas es importante considerar el proceso de maduración, que es un fenómeno bioquímico que condiciona cambios metabólicos, modificaciones de aspecto y atributos de calidad ⁽¹¹⁾.

El proceso de maduración va acompañado de cambios metabólicos, que a su vez implican cambios de duro a blando, de amargo a dulce y de verde a otros colores de diversas tonalidades. El cambio de color de frutos durante la maduración es muy típico y suele deberse a la degradación de la clorofila, haciendo visibles otros pigmentos que se encontraban encubiertos ⁽¹²⁾.

La mayoría de las frutas y vegetales deben su color a sus correspondientes pigmentos, que son sustancias con una función biológica muy importante en el tejido. Existe una gran cantidad de pigmentos relacionados con las frutas y vegetales, entre ellos las clorofilas, los carotenoides, las antocianinas, los flavonoides, los taninos, las betalaínas y otros ⁽¹³⁾.

Índice de color

El color puede ser evaluado mediante la determinación del índice de color IC* obtenido por la expresión (1) donde I*, a*, y b* son los parámetros del sistema color CIELAB.

El parámetro I* proporciona un valor de la luminancia, claridad o brillo de la muestra en una escala de 0 a 100. Los parámetros a* y b* se extienden de -100 a +100, a* es negativo para el verde y positivo para el rojo. El parámetro b* es negativo para el azul y positivo para el amarillo ⁽¹⁴⁾.

$$IC^* = \frac{1000 \times a^*}{I^* \times b^*} \quad (1)$$

2.5 Compuestos fenólicos

Químicamente los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en

forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es la forma de glicósidos, siendo solubles en agua y en solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa, L-ramnosa, D-xilosa y ácidos D-glucorónico y D-galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos, y a otros compuestos fenólicos.

Según Harborne (1989) citado por Martínez-Valverde ⁽¹⁵⁾, los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, describiéndose a continuación aquellas con mayor interés nutricional ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾:

a) Fenoles, ácidos fenólicos y fenil acéticos

Dentro de este grupo se encuentran el fenol, cresol, timol y resorcinol distribuidos en todas las especies vegetales. Igualmente los ácidos fenólicos tales como el gálico, vainílico, p-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas superiores y helechos ⁽¹⁸⁾.

b) Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran raramente libres, ya que por regla general se hayan presentes en forma de derivados.

Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido, mientras que los cromonoles son menos conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio ⁽¹⁹⁾.

c) Lignanós y neolignanós

Son metabolitos de bajo peso molecular formados por el acoplamiento oxidativo de unidades de p-hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno. Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y también del alcohol cinámico, propenilbenceno y

alilbenceno. El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de aniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano ⁽²⁰⁾.

d) Flavonoides

Constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación dividiéndose en varias subclases con más de 5,000 compuestos, siendo los polifenoles mas distribuidos en las plantas. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos; dos anillos bencenos unidos a través de un anillo pirona o piran heterocíclico. Esta estructura básica presenta o permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanolles, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas o taninos condensados. En la figura N° 1 se muestra el núcleo principal flavonoide, y la figura N° 2 se muestra la estructura principal de los principales flavonoides presentes en la naturaleza ⁽²¹⁾.

e) Taninos:

Son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500D y 3000D. Estos compuestos contienen un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100D), siendo por tanto capaces de unirse a proteínas y a otras moléculas.

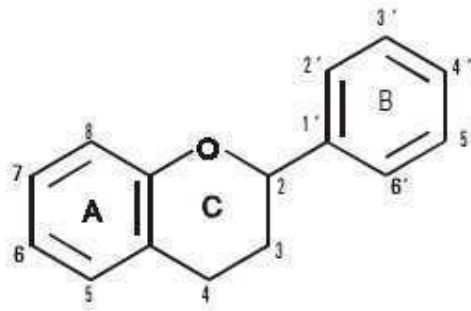


Figura N° 1: Núcleo principal de la estructura de los flavonoides

Fuente: Duran D y Col, 2008 ²².

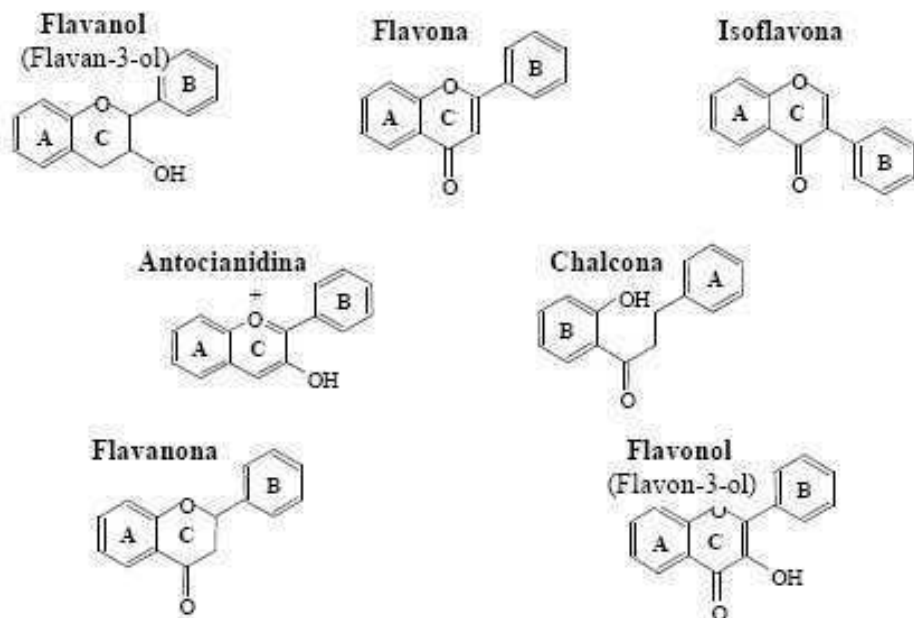


Figura N° 2: Principales estructuras básicas de los flavonoides ⁽²²⁾.

Fuente: Duran D. y Col, 2008 ²².

2.6 Antocianinas

2.6.1 Generalidades

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de los frutos o flores, es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano.

Las antocianidinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilio, y debido a la poca solubilidad de estas en el agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza sino en su forma glicosilada, siendo una de las mas abundantes la cianidina 3-glucósido



Figura N° 3: Estructura mas común de la antocianidina glucosilada ⁽²³⁾.

Fuente: Malacrida C y Col, 2005 ²³.

2.6.2 Estructura química

Las antocianinas son glicósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, están compuestos por dos anillos aromáticos A y B, y un anillo heterocíclico que se caracteriza por la presencia de un ión oxonio ^{(24) (25)}.

Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas:

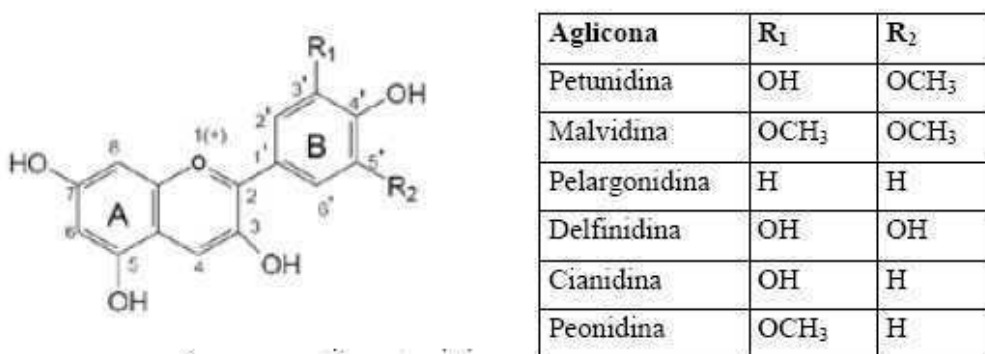


Figura N° 4: Estructura y sustituyentes de las antocianidinas ⁽²⁶⁾.

Fuente: Rockenbach I. y Col, 2008 ²⁶.

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Un incremento en la hidroxilación produce desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que un incremento en las metoxilaciones produce coloraciones rojas ^{(27) (28) (29)}.

Tabla N° 1: Color y distribución de las principales antocianidinas en algunas frutas y vegetales comunes ⁽³⁰⁾.

Compuesto	Color	Frutos y vegetales
Delfinidina	Rojo azulado	Uva concordia, mirtillo, bilberry, grosella negra.
Cianidina	Rojo naranja	Fresa, mora, ruibarbo, grosella negra, cereza, col roja, bilberry, arandino, saúco, uva concordia, maíz, ciruela, frambuesa, cebolla roja.
Pelargonidina	Naranja	Fresa, maíz.
Malvidina	Rojo azulado	Uva, mirtillo, bilberry.
Peonidina	Rojo	Cereza, arandino

Tabla N° 2: Contenido de antocianinas totales en frutas y vegetales comunes.

Fruto	Contenido de antocianinas totales mg/100g
Manzana	83-326
Bilberry	300-320
Mora	83-326
Grosella negra	130-400
Mirtillo	25-495
Col roja	25
Cereza	4-450
Arándano	60-200
Saúco	450
Uvas	6-600
Kivi	100

Cabollas rojas	7-21
Ciruelas	2-25
Rábanos rojos	11-60
Frambuesa negra	300-400
Frambuesa roja	20-60
Fresas	15-35

Fuente: Burin B. y Col, 2010 ⁽³¹⁾.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, L-ramnosa, D-arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sináptico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Se ha demostrado que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura. ⁽³²⁾

2.6.3 Biosíntesis

Las antocianinas se sintetizan a partir de la condensación de dos moléculas precursoras (Figura N° 5): Malonil CoA y p-cumaril-CoA, las que mas tarde formaran anillos A y B respectivamente.

Las antocianinas son sintetizadas por varias rutas. Sobresalen dos, la del ácido shikímico y la del ácido malónico. En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y Ciclo de Calvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-coumárico, caféico, ferúlico, clorogénico y fenilalanina.

Cabe resaltar que esta ruta sintética también es compartida por otros compuestos fenólicos. La principal reacción de biosíntesis de los flavonoides es la condensación de los acilos provenientes de cumaril-CoA y tres moléculas de malonil CoA catalizada por la enzima chalcona isomerasa que lleva a cabo la isomerización de chalcona a flavona, la misma que es convertida en flavones o antocianinas. Los pasos finales en la síntesis de antocianinas son las acilaciones y las glucosilaciones, primero en el C-3, para estabilizar el catión flavilio ⁽³³⁾.

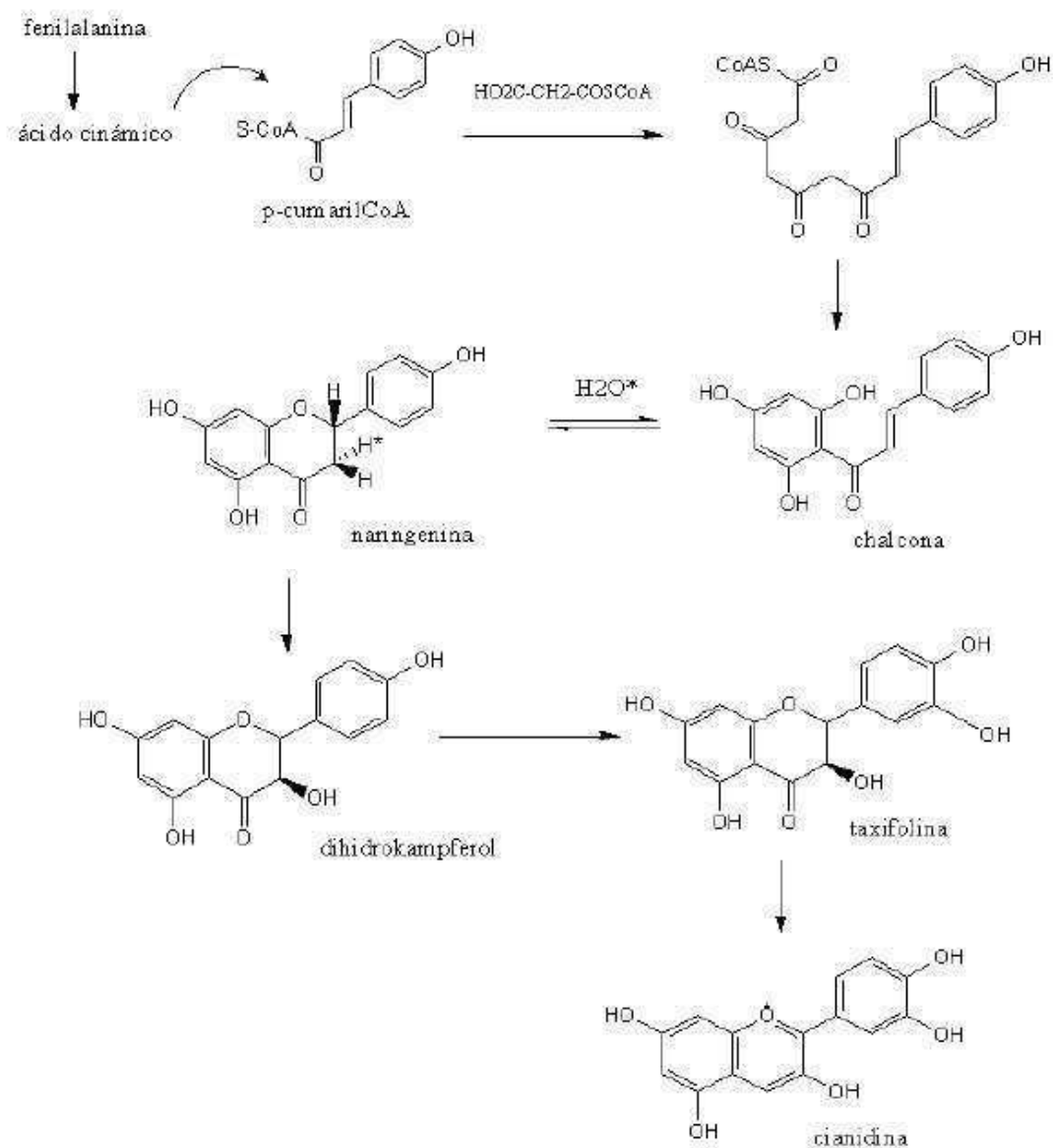


Figura N° 5: Biosíntesis de la cianidina

Fuente: Gauche C. y Col, 2010 ³³.

2.6.4 Distribución en la naturaleza

Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de las frutas como manzanas, peras, zarzamoras; de flores como la jamaica y rosas; y verduras como la col morada y maíz morado. La función que cumplen es la de atraer seres vivos para propósitos de polinización y dispersión de semillas. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el

color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, entre otros ⁽³⁴⁾.

2.6.5 Estabilidad

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy frágil en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran.

Factores como su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento.

Estructura de las antocianina

Las antocianinas por su diversidad estructural no son igualmente resistentes a los efectos de deterioro de varios agentes. Cuando el grado de hidroxilación de la aglicona se incrementa, la estabilidad generalmente decrece; por otro lado la sustitución con grupos metoxilos tiene un efecto contrario. La glicosidación de los grupos hidroxilo libres incrementa la estabilidad, similar efecto al de la metoxilación presumiblemente debido al bloqueo de los grupos hidroxilos reactivos. Las antocianinas diglicosiladas son más estables a la decoloración durante el almacenamiento, calor y exposición a la luz que los monoglicósidos. La naturaleza del azúcar también tiene efecto protector.

La estabilidad de especies coloreadas, especialmente la base quinoidal, quizá está proporcionada por la presencia de grupos acilo ligados a los azúcares en la molécula, esto es, por copigmentación intramolecular.

Antocianinas que contienen dos o más grupos muestran una excelente estabilidad a través de un completo rango de pH. La estabilidad conferida por la copigmentación intramolecular se atribuye al apilamiento de residuos aromáticos del grupo acilo con el anillo piranósido en la molécula de antocianina ^{(35) (36) (37) (38)}.

Efecto del pH ^{(39) (40)}.

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH⁺) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A⁻) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire.

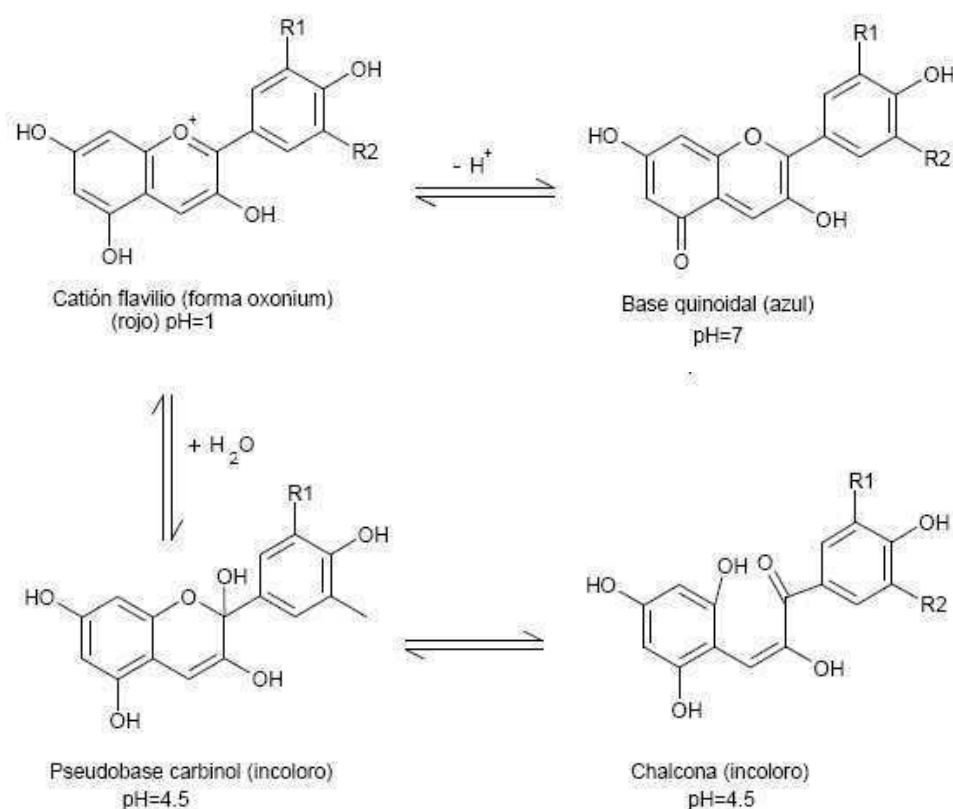


Figura N° 6: Estructura y estabilidad de las antocianinas a diferentes valores de pH.

Fuente: Villanueva J. y col, 2010 ³⁹.

Efecto de la temperatura:

Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras ^{(41) (42)}.

2.6.6 Ensayos cromatográficos

El color y comportamiento cromatográfico proporcionan datos relevantes para su preparación e identificación (valores de R_f).

De las técnicas fitoquímicas como las cromatografías en papel (CP), capa fina (CCF), columna (CC) y gas líquido (CGL), la más común es la CP-descendente por ser un método de bajo costo y práctico que utiliza eluyentes como BAW (n-butanol-ácido acético glacial-agua, 4:1:5), BuHCl (n-butanol-ácido clorhídrico 2N, 1:1, fase superior), Forestal (ácido clorhídrico concentrado-ácido acético glacial-agua, 3:30:10), HCl 1% (ácido clorhídrico concentrado –agua, 3:97) y fórmico (ácido clorhídrico concentrado-ácido fórmico-agua, 2:5:3).

La separación de antocianinas por las técnicas cromatográficas, de modo particular la cromatografía en papel (CP) descendente, asociado con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) constituye una técnica muy utilizada.

Para complementar la identificación, existen técnicas físicas como la espectrometría de masas (EMS), resonancia magnética nuclear (RMN), entre otras ⁽⁴³⁾.

2.6.7 Propiedades biológicas

Estudios epidemiológicos efectuados en varios países evidencian que el consumo de frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer. Se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan dentro de la célula actividad antioxidante, reduciendo la concentración de radicales libres, y en algunos casos logran establecer grupos de quelación con iones metálicos. Los mecanismos involucrados de los agentes antioxidantes establecen donación

de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en los alimentos pueden reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación. Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se encuentran las antocianinas debido a la presencia de sustituyentes oxidrilo, las cuales son moléculas con alto poder antioxidante ⁽⁴⁴⁾.

2.7 Radicales libres

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. También pueden ser radicales libres los iones metálicos y el átomo de hidrogeno.

Su vida es muy breve (del orden del milisegundo o menos), aunque los núcleos asimétricos contribuyen a la formación de radicales de larga vida ⁽⁴⁵⁾.

2.7.1 Producción de radicales libres de oxígeno

Se forman de manera ilimitada durante el metabolismo celular normal, por lo que entre las fuentes endógenas de radicales libres del oxígeno se pueden mencionar las cadenas de transporte de electrones mitocondrial y microsomal, reacciones catalizadas por oxidasas y oxigenasas, reacciones de auto oxidación de metales, actividad de células fagocíticas (granulocitos, macrófagos, células endoteliales) y transporte de oxígeno por la hemoglobina ⁽⁴⁶⁾.

2.7.2 Reactividad de los radicales libres y estrés oxidativo

La reactividad de los radicales libres es muy diferente, algunos son relativamente estables, pero la mayoría de los que tienen interés biológico son extremadamente reactivos e inestables y, como resultado tienen una vida media muy corta. El radical hidroxilo es el más reactivo de los radicales oxigenados y por su corta vida media (pocos microsegundos) su radio de acción efectivo en la célula es de aproximadamente 30\AA .

Los radicales libres pueden actuar como oxidantes o reductores. Cuando reaccionan con un compuesto se pueden formar otros radicales libres, es decir,

se producen reacciones en cadena, por ejemplo, la peroxidación lipídica. Aunque el radical libre inicial origina solamente efectos locales, los radicales secundarios derivados de él y los productos de degradación formados pueden tener efectos biológicos distantes del sitio donde se generó el primer radical. Cuando dos radicales actúan entre sí, se puede formar una molécula estable, con lo cual se terminan las reacciones en cadena.

El radical superóxido (O_2^*) no es particularmente reactivo pero es potencialmente tóxico. Puede influir directamente en la homeostasis local, por ejemplo, oxidando catecolaminas, y lo que es más importante, puede transformarse en el radical hidroxilo (OH^*) que es muy peligroso.

El H_2O_2 no es especialmente tóxico para las células, pero puede atravesar membranas y esto es importante, porque el medio extracelular posee muy pocos mecanismo de defensa antioxidante. En presencia de trazas de iones metálicos de transición se forman radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton) y también por interacción entre el radical superóxido y H_2O_2 (reacción Haber-Weiss) ⁽⁴⁷⁾.

2.7.3 Daño molecular inducido por radicales libres

Los radicales libres ejercen efectos útiles y nocivos. Entre los útiles se puede mencionar el papel de defensa que cumplen los producidos por los fagocitos en la destrucción de organismos invasores; además, algunas reacciones enzimáticas transcurren posiblemente por mecanismos radicales (caso de la ciclooxigenasa y tromboxano sintetasa).

En cambio, los efectos nocivos son numerosos, por dañar lípidos, proteínas, carbohidratos, entre otros ⁽⁴⁸⁾.

2.8 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan los radicales libres o sus acciones. La naturaleza ha dotado a cada célula con adecuados mecanismos de protección contra cualquier efecto perjudicial de los radicales libres: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, tioredoxina, enlaces tiol y disulfuro son sistemas amortiguadores de cada célula. La alfa tocoferol

(vitamina E) es un nutriente esencial el cual funciona como antioxidante rompedor de cadenas, el cual previene la propagación de las reacciones de radicales libres en todas las membranas celulares. El ácido ascórbico (vitamina C) es también parte del mecanismo normal de protección. Otros antioxidantes no enzimáticos incluyen a los carotenoides, flavonoides, y polifenoles relacionados, ácido lipoico, el glutatión entre otros ⁽⁴⁹⁾.

2.8.1 Niveles de la acción antioxidante

Los antioxidantes capaces de neutralizar a los radicales libres o sus acciones, actúan a diferentes fases. Actúan a niveles de prevención, interceptación y reparación. La acción preventiva, busca evitar la formación de los radicales libres de oxígeno (ROS). Estos incluyen a la SOD, que cataliza la dismutación O_2^* a H_2O_2 y la catalasa que lo transforma en agua. La interceptación de los radicales libres es principalmente por secuestro del radical, los radicales peróxido son los principales afectados en esta etapa. Los efectores incluyen a varios antioxidantes como las vitaminas A y E, glutatión, otros compuestos con grupo tiol, carotenoides, flavonoides, entre otros. En el nivel de reparación y reconstitución están comprometidos sistemas enzimáticos principalmente ⁽⁵⁰⁾.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima y en el Laboratorio del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina de la ciudad de Lima, durante los meses de noviembre 2010 a setiembre 2011.

3.2 Materiales y reactivos

Materiales

Cuba de desarrollo cromatográfica, cubetas para espectrofotómetro, papel de filtro, material de vidrio, Columna C18 Atlantis (Waters, Mildford MA).

Equipos

Balanza analítica Ohaus, estufa Memmert, espectrofotómetro ultravioleta Hewlett Packard, colorímetro Konica Minolta Modelo CR410, HPLC en fase reversa en un Modulo de Separación 2695 (Waters, Milford, MA) equipado con un auto inyector, un detector fotodiodo de serie 996 (DAD), y un software Empower.

Reactivos

Etanol 96°, metanol, ácido clorhídrico, 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), ácido fosfórico, acetonitrilo, ácido acético. Todos ellos fueron grado reactivo.

3.3 Muestra vegetal

Selección de los frutos

Se procedió a la selección de los frutos teniendo en cuenta su color, es decir, solo fueron seleccionados los frutos rojos.

Los frutos rojos de ***Prunus domestica* L.** fueron recolectados en Laraos situado en la zona norte de la provincia de Yauyos, región Lima, ubicado a una altitud de 3,310 m.s.n.m.; entre los meses de noviembre 2010 y marzo 2011.



Figura N° 7: Fotografía del fruto de ***Prunus domestica* L.**

Los frutos rojos de ***Ficus carica* L.** fueron recolectados en el distrito de Chilca, provincia de Cañete a 63,5 Km. al sur de Lima entre los meses de noviembre 2010 a marzo 2011.



Figura N° 8: Fotografía del fruto de ***Ficus carica* L.**

Los frutos rojos de ***Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe"** fueron recolectados en El Pedregal ubicado en el Distrito de los Aquijes, en el valle de Ica, región Ica; en los meses de noviembre 2010 a marzo 2011.



Figura N° 9: Fotografía del fruto de ***Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe"**.

A una parte de los frutos frescos se le realizó el índice de color. A la otra parte se le sometió a liofilización previo lavado, licuado y filtrado usando como solvente HCl 0,1% en agua. La liofilización se realizó en el Laboratorio de Agroindustria de la Universidad Nacional Del Santa, Nuevo Chimbote, en la ciudad de Ancash; obteniéndose un polvo seco de color rojo oscuro, almacenándose en paquetes al vacío para el aislamiento e identificación de las antocianinas.

3.4 Ensayos Químicos

3.4.1 Índice de color

El color se midió con un colorímetro Konica Minolta modelo CR-410, los datos se reportan en valores L^* , a^* , b^* de la escala CIELAB. En cada fruto se hicieron 5 lecturas que corresponden al área cercana al pedúnculo, al centro y al área cercana al ápice en los dos lados opuestos del fruto ⁽⁵¹⁾.

3.4.2 Extracción, purificación y separación de las antocianinas para análisis por espectrofotometría UV/VIS

■ Extracción de antocianinas

Para la extracción de antocianinas se maceró el liofilizado de los frutos con pequeñas cantidades de HCL (0,1%) en metanol a temperatura ambiente ⁽⁵²⁾.

■ Purificación de las antocianinas

Se realizó una cromatografía preparativa descendente con papel Whatman N° 3, las muestras (extracto crudo) se aplicaron en bandas de 2,5 cm de longitud y 1,5 de separación entre cada una. Los papeles se colocaron en una cámara de cromatografía. El eluyente utilizado fué BAW (n-butanol-acido acético-agua, 4:1:5) ⁽⁵³⁾.

■ Aislamiento de las antocianinas

Se procedió a recortar las bandas coloreadas y eluirlas en HCl 0,01% en metanol a fin de leer sus valores espectrales en el espectrofotómetro UV SPS-100 PYE UNICAM o UV/VIS Perkin Elmer LAMBDA 2, en el rango de 300 a 600nm.

Los valores de R_f y espectrales obtenidos fueron comparados con datos de literatura.

El uso de eluyentes adicionales permite comparar los diferentes valores de R_f de acuerdo con su polaridad ⁽⁵⁴⁾.

3.4.3 Extracción, purificación, e identificación de las antocianinas por cromatografía HPLC ⁽⁵⁵⁾

■ Preparación de los extractos

0,7g de la muestra de fruto liofilizado fue colocada en un vial con tapa rosca, dicho vial fue envuelto con una película de aluminio. A la muestra se le colocó 42 mL de HCl 0,1% en 90% de MeOH. Se limpió el vial con nitrógeno por tres minutos. El vial fue colocado en un baño de agua a temperatura ambiente por 60 minutos bajo agitación (200 r.p.m). Luego, el extracto fue centrifugado a 27000g por 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante fue colectado. La extracción arriba indicada fue repetida con 20 mL del solvente por 15 minutos. Los sobrenadantes fueron combinados y evaporados en un rotavapor a temperatura inferior a 40 °C. El residuo fue diluido con agua acidificada (0,01% HCl) para posterior purificación e identificación de las antocianinas.

■ Purificación de los extractos

La purificación fue llevada a cabo usando cartuchos de extracción de fase sólida (SPE). Un total de tres ml del extracto fue pasado a través de un cartucho C18 Sep-Pak (Waters, Milford, MA) previamente activado con metanol y agua acidificada (HCl 0,01%). El cartucho fue luego limpiado con agua acidificada (HCl 0,01%) para remover azúcares, ácidos y otras sustancias interferentes. La elusión de las antocianinas fue lograda con metanol acidificado (HCl 0,01%). Después, el eluato metanólico fue concentrado al vacío (40 °C) a fin de retirar el solvente, y el residuo fue disuelto en HCl 0,01% acuoso hasta un volumen final de 3mL. El extracto fue mantenido a -20 °C hasta analizarlo por HPLC.

■ Identificación de antocianinas

Las antocianinas fueron separadas usando HPLC en fase reversa en un Modulo de Separación 2695 (Waters, Milford, MA) equipado con un auto

inyector, un detector fotodiodo de serie 996 (DAD), y un software Empower. La data espectroscópica se leyó entre 200 y 700 nm. Se empleó una columna C18 Atlantis 150 x 4.6 mm i.d. 5 μ m (Waters, Milford, MA) y una columna de 4,6 mm x 2,0 mm para la separación de las antocianinas a 40 °C.

La fase móvil estuvo compuesta de: a) agua:ácido fosfórico (100:0,85, v/v) a pH 2,17 y b) agua/acetonitrilo/ácido acético/ácido fosfórico (50,3:49,1:0,4:0,2, v/v a pH 2,27. La gradiente de solvente fue de 20 a 38 % de B en 13 minutos, seguido de un incremento a 40% de B en un minuto y un incremento a 50 % de B en 11 minutos. Una tasa de flujo de 0,7 mL/min fue usada, y 20 μ L de muestra fue inyectada.

La elución de los picos fue monitorizada a 520 nm. Las muestras y las fases móviles fueron filtradas a través de un filtro de 0.22 μ m, tipo GV (Millipore, Bedford, MA) antes de la inyección al HPLC. Las antocianinas y antocianidinas fueron identificadas mediante comparación con los tiempos de retención y datos espectroscópicos del UV/VIS del arte previo.

3.4.4 Identificación de los azúcares monosacáridos ⁽⁵⁶⁾

Se pesó 1g de muestra y se mezcló con agua, se homogenizó la muestra en un mortero y luego se filtró. Al líquido se le agregó ácido sulfúrico concentrado hasta hacer una concentración al 10 % y se lo colocó en un vial a 60 °C por 48 horas.

Transcurrido el tiempo se filtró y al líquido se lo neutralizó con carbonato de calcio, el precipitado se lavó con agua y la solución se evaporó hasta un volumen pequeño.

El ensayo cromatográfico se realizó sobre papel Whatman N° 1, usando como sistema de solventes n-butanol/etanol/agua en la proporción de 4/1/5; y como revelador el ftalato ácido de anilina. El desarrollo cromatográfico comprendió estándares de D-galactosa, D-xilosa, L-ramnosa y D-glucosa.

3.4.5 Cuantificación de antocianinas totales empleando el método de pH diferencial ⁽⁵⁷⁾

Los pigmentos antociánicos sufren transformaciones estructurales reversibles por el cambio de pH, ello se evidencia en el espectro de absorbancia. Así pues,

la forma oxonio es coloreado y predomina a pH 1,0; y la forma hemiacetal sin color a pH 4,5. El método de pH diferencial esta basado en esta reacción y permite una rápida medida de las antocianinas totales en presencia de pigmentos polimerizados degradados y otros compuestos interferentes.

Reactivos:

Buffer de cloruro de potasio 0,025M, pH 1.

Buffer de acetato sódico 0,4M, pH 4,5.

- 1) Se determinó el factor de dilución apropiado para la muestra mediante dilución con buffer de cloruro de potasio, pH 1,0, hasta que la absorbancia de la muestra a $\lambda_{vis-max}$ estuvo dentro del rango linear del espectrofotómetro (por ejemplo, para la mayoría de espectrofotómetros la absorbancia debería ser menor a 1,2). El volumen final se dividió entre el volumen inicial de la muestra a fin de obtener el factor de dilución (240).
- 2) El espectrofotómetro se llevó a cero con agua destilada hasta los 700nm.
- 3) Se prepararon dos diluciones de la muestra, una con buffer cloruro de potasio pH 1,0, y la otra con buffer acetato de sodio pH 4,5, diluyendo cada una de acuerdo al factor de dilución. Se dejó equilibrar la dilución por 15 minutos.
- 4) Se midió la absorbancia de la dilución final a la $\lambda_{vis-max}$ y a 700 nm, y se llenó la celda blanco con agua destilada.
- 5) Se calculó la absorbancia de la muestra diluida (A) utilizando la siguiente fórmula:

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$
- 6) Se calculó la concentración de pigmentos de antocianinas monoméricas en la muestra original empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Pigmento de antocianinas monoméricas (mg/100g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1}$$

PM es el peso molecular.

FD es el factor de dilución.

ϵ es la absortividad molar.

A es absorbancia de la muestra diluida.

El ϵ de la cianidina 3-glucosido es 26,900, y el PM es 449.2.

3.5 Ensayos biológicos

Capacidad antioxidante ⁽⁵⁸⁾

■ Fundamento del método:

El DPPH es un radical libre y acepta un electrón o un radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable. Para evaluar la potencia antioxidante mediante el barrido de radicales en las muestras del análisis, se registra la densidad óptica de los radicales DPPH. Por ello, el DPPH se utiliza habitualmente como sustrato para evaluar la actividad antioxidante. La actividad antioxidante o antirradical se medirá mediante el descenso en la absorbancia a 517 nm de una solución metanólica (20 mg/L) de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

■ Procedimiento

Se preparó una solución de DPPH 2 mg en 100 mL de metanol. Luego se preparó una solución de los extractos solubles en solvente previa prueba de solubilidad, en una concentración de 600 µg/mL. A partir de este se prepararon diferentes soluciones dando concentraciones de 25, 50, 75, 100 y 200 µg/mL. El blanco de muestra se preparó con 0,4 mL de muestra (solución de extracto) y 0,8 mL de metanol. Luego se preparó el patrón de referencia 0,4 mL de metanol y 0,8 mL de solución de DPPH. Se procedió a preparar la muestra con 0,4 mL de solución de los extractos y 0,8 mL de DPPH, se deja por 30 minutos en la oscuridad y se lee a 517 nm, en el espectrofotómetro. Se midió la absorbancia del patrón de referencia y del blanco de la muestra. Como estándar se utilizó ácido ascórbico.

La fórmula para calcular la Capacidad Antioxidante es la siguiente:

$$\% \text{ de la capacidad antioxidante} = \frac{[1 - (\text{Abs. de la muestra} - \text{Abs. blanco muestra})]}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

Las muestras se corren por triplicado

La IC50 se calcula en base a la fórmula de la pendiente, como una reducción del 50% en la absorbancia ocasionada por los extractos.

IV. RESULTADOS

■ Ensayos químicos

Color de los frutos

TABLA N° 3: Lecturas colorimétricas de los valores de L^* , a^* y b^* , e índice de color (IC^*) correspondientes a *Prunus domestica* L. utilizando los parámetros del sistema CIELAB.

	L^*	a^*	b^*	Índice de color (IC^*)
Ciruela	24,02	10,41	1,48	164,52
	27,07	23,01	5,44	
	24,25	19,17	3,31	
	26,88	16,31	3,52	
	28,6	30,97	9,44	
	Promedio	Promedio	Promedio	
	26,16	19,90	4,64	

TABLA N° 4: Lecturas colorimétricas de los valores de L^* , a^* y b^* , e índice de color (IC) correspondientes a *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”, utilizando los parámetros del sistema CIELAB.

	L^*	a^*	b^*	Índice de color (IC^*)
Uva	29,77	8,86	1,80	177,22
	26,05	7,61	1,51	
	31,53	8,39	1,71	
	29,68	7,37	1,73	
	32,35	7,20	0,71	
	Promedio 29,88	Promedio 7,89	Promedio 1,49	

TABLA N° 5: Lecturas colorimétricas de los valores de L^* , a^* y b^* , e índice de color (IC) correspondientes a ***Ficus carica L.*** utilizando los parámetros del sistema CIELAB.

	L^*	a^*	b^*	Índice de color (IC*)
Higo	19,15	5,56	5,86	53,04
	19,69	5,64	5,61	
	18,70	4,83	5,13	
	24,48	8,84	6,99	
	22,09	7,99	6,14	
	Promedio 20,82	Promedio 6,57	Promedio 5,95	

TABLA Nº 6: En la presente tabla se presenta un resumen del índice de color correspondientes a los frutos de ***Ficus carica L***, ***Prunus domestica L*** y ***Vitis vinifera L c.v. “Red Globe”*** utilizando los parámetros del sistema CIELAB.

	COLOR			IC*
	I*	a*	b*	
HIGO	20,82	6,57	5,95	53,04
CIRUELA	26,16	19,90	4,64	164,52
UVA	29,88	7,89	1,49	177,22

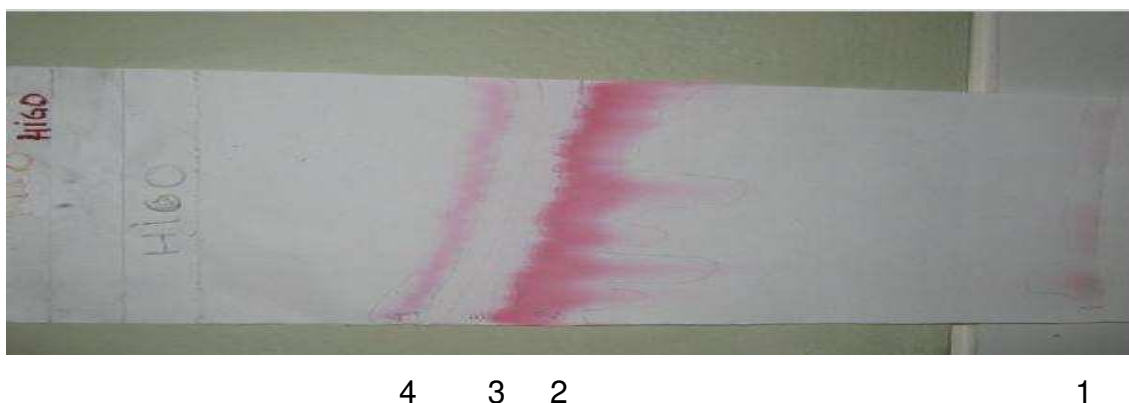


Figura Nº 10: Cromatograma del extracto de *Ficus carica L.* sobre papel Whatman Nº 3 y como fase móvil BAW. En ella se advierten 4 bandas coloreadas (1, 2, 3 y 4), las que fueron eluidas en HCl 0,01% en metanol y leídas en el espectrofotómetro.

Tabla Nº 7: En la presente tabla se muestran los valores del λ máximo, el λ 440, y el $E \lambda 440 / \lambda \text{ max}$ de las bandas eluidas de la muestra de *Ficus carica L.*

	$\lambda \text{ max}$	$\lambda 440$	$E \lambda 440 / \lambda \text{ max}$	Posible antocianina
Banda 1	(528 nm) 0,0332	0,0294	88,55	-
Banda 2	(530 nm) 1,5669	0,3465	22,11	Cianidina
Banda 3	(530 nm) 0,121	0,0285	23,55	Cianidina
Banda 4	(526 nm) 0,0778	0,0247	31,74	-

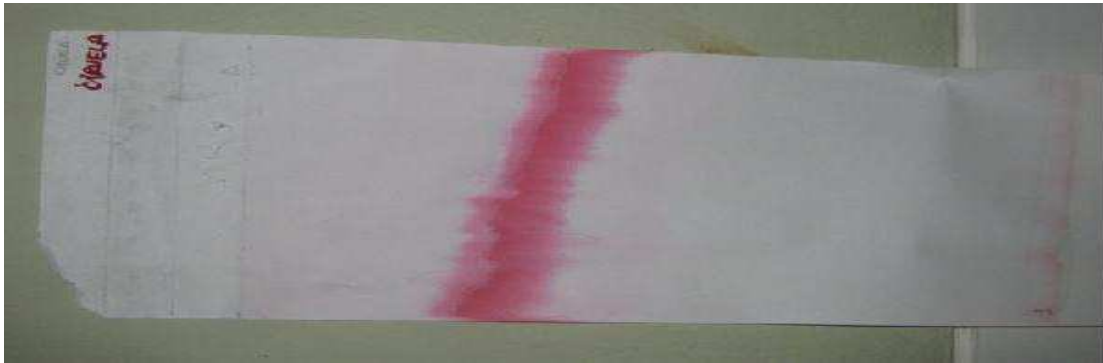


Figura N° 11: Cromatograma de los extractos de *Prunus domestica* L. sobre papel Whatman N° 3 y como fase móvil BAW. En ella se advierten 4 bandas coloreadas (1, 2, 3 y 4), las que fueron eluidas en HCl 0,01% en metanol y leídas en el espectrofotómetro.

Tabla N° 8: En la presente tabla se muestran los valores del $\lambda_{\text{máximo}}$, el λ_{440} , y el $E_{\lambda 440/\lambda_{\text{max}}}$ de las bandas eluidas de la muestra de *Prunus domestica* L. precedente.

	λ_{max}	λ_{440}	$E_{\lambda 440/\lambda_{\text{max}}}$	Posible antocianina
Banda 1	(522 nm) 0,0393	0,346	88,04	-
Banda 2	(528 nm) 0,3158	0,0867	27,45	Peonidina
Banda 3	(530 nm) 1,2257	0,2724	22,15	Cianidina
Banda 4	(530 nm) 0,0995	0,041	41,2	-

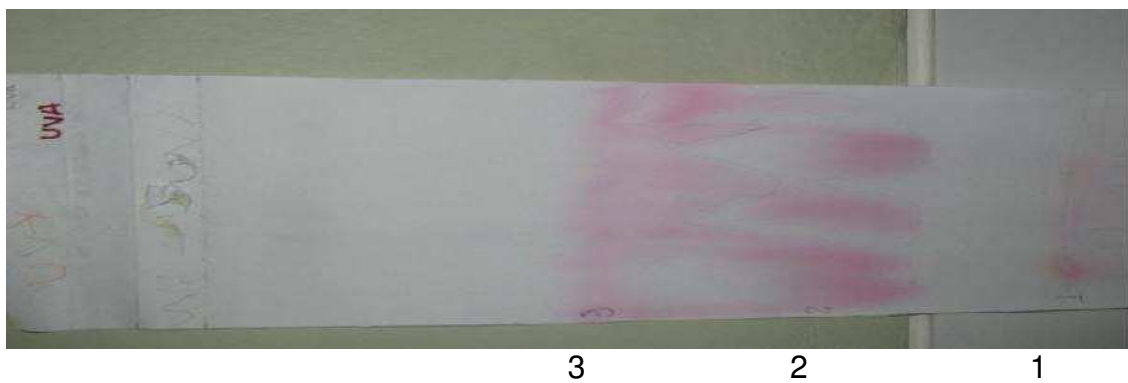


Figura N° 12: Cromatograma de los extractos de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” sobre papel Whatman N° 3 y sistema de solvente BAW. En ella se advierten 3 bandas coloreadas (1, 2 y 3), las que fueron eluidas en HCl 0,01% en metanol y leídas en el espectrofotómetro.

Tabla N° 9: En la presente tabla se muestran los valores del λ máximo, el λ 440, y el $E \lambda$ 440/ λ max de las bandas eluidas de la muestra de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” precedente.

	λ max	λ 440	$E \lambda$ 440/ λ max	Posible antocianina
Banda 1	(526 nm) 0,0579	0,0275	47,49	Peonidina
Banda 2	(528 nm) 0,3137	0,0874	27,86	Cianidina
Banda 3	(531 nm) 0,0716	0,0304	42,45	Malvidina

Para complementar el estudio se analizó cromatográficamente las antocianinas de los frutos de ***Ficus carica* L.** usando como fase móvil el AWH (Ácido acético/agua/ácido clorhídrico 15/82/3 V/V/V). Se evidenció la presencia de una antocianina cuyo R_f era 72.

Del mismo modo, se analizó cromatográficamente las antocianinas de los frutos de ***Prunus domestica* L.** usando como fase móvil el AWH (ácido acético/agua/ácido clorhídrico 15/82/3 V/V/V). Se evidenció la presencia de dos antocianinas cuyos R_f eran de 47,4 y 71,2.

Las antocianinas de los frutos de ***Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe"** también fueron analizadas por CP usando como fase móvil el AWH (ácido acético/agua/ácido clorhídrico 15/82/3 V/V/V). Se evidenció la presencia de dos antocianinas cuyo R_f era 45,1 y 55,3.

Los análisis cromatográficos del hidrolizado de los extractos de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”, *Prunus domestica* L. y *Ficus carica* L. se observan en las Figuras N° 13, 14 y 15.



Figura N° 13: Cromatograma de los azúcares obtenido por hidrólisis de la muestra de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” sobre papel Whatman N° 1 usando como revelador: ftalato ácido de anilina y como sistema de solventes n-butanol/etanol/agua en la proporción de 4/1/5.

De izquierda a derecha se advierte: La muestra problema, y los estándares D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa y D-galactosa, respectivamente.

Se observa que la muestra de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” (izquierda) presenta D-glucosa (Rf 22).

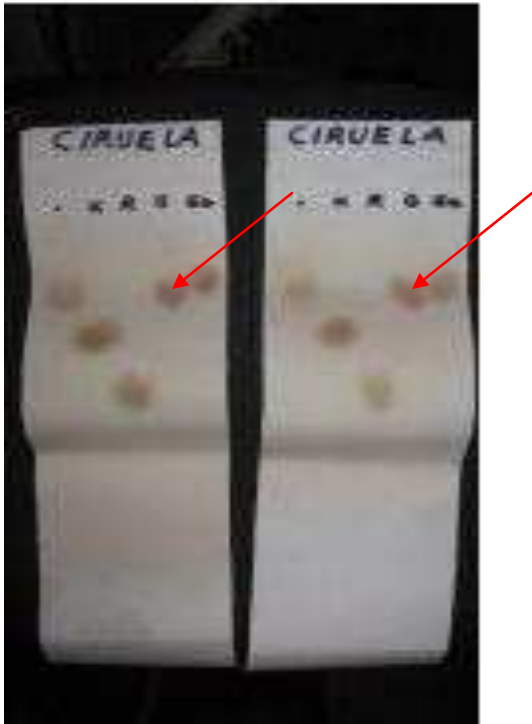


Figura N° 14: Cromatograma de los azúcares obtenido por la hidrólisis de la muestra de *Prunus domestica* L. sobre papel Whatman N° 1 usando como revelador: ftalato acido de anilina y como sistema de solventes n-butanol/etanol/agua en la proporción de 4/1/5.

De izquierda a derecha se advierte: La muestra problema, y los estándares D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa y D-galactosa, respectivamente.

Se observa que la muestra de *Prunus domestica* L. (izquierda) presenta D-glucosa (Rf 22).

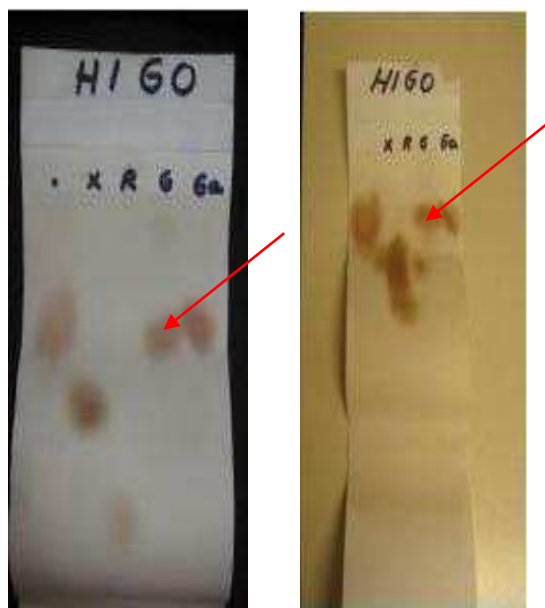


Figura Nº 15: Cromatograma de los azúcares obtenido por hidrólisis de la muestra de *Ficus carica* L. sobre papel Whatman Nº 1 usando como revelador: ftalato ácido de anilina y como sistema de solventes n-butanol/etanol/agua en la proporción de 4/1/5.

De izquierda a derecha se advierte: La muestra problema, y los estándares D-xilosa, D-ribosa, D-glucosa y D-galactosa, respectivamente.

Se observa que la muestra de *Ficus carica* L. (izquierda) presenta D-glucosa (Rf 0.22).

Estudios en HPLC

Extracción, purificación, e identificación de las antocianinas por cromatografía



Figura Nº 16: Muestras de antocianinas purificadas de los frutos de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”, *Prunus domestica* L. y *Ficus carica* L. que sirvieron para la evaluación por HPLC.

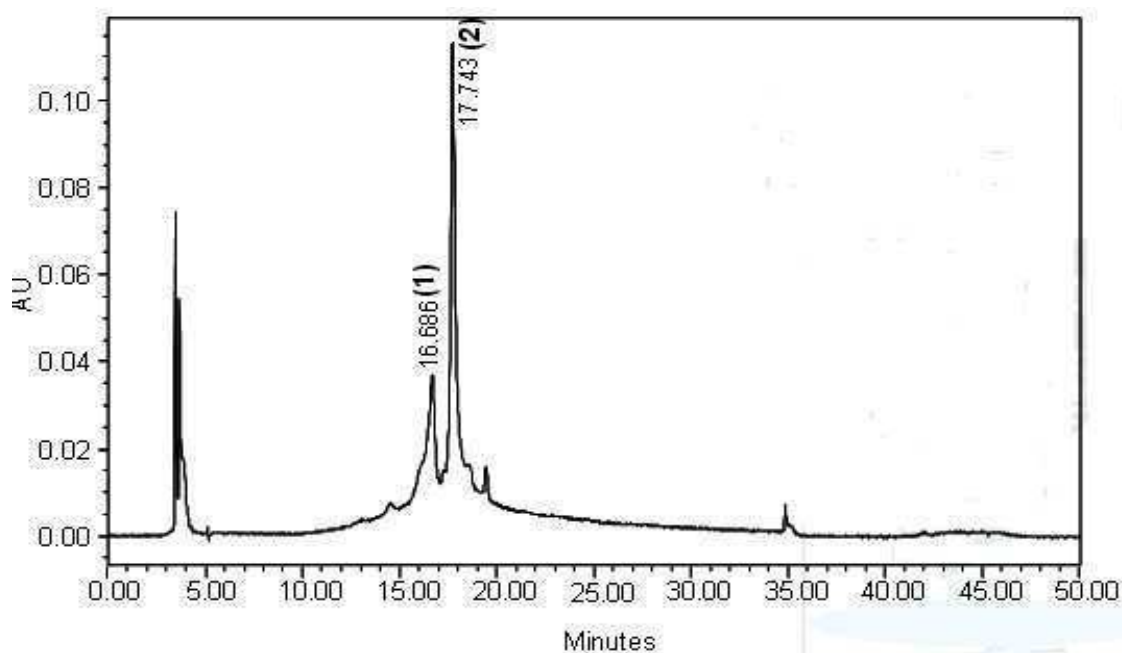


Figura Nº 17: Cromatograma HPLC de *Ficus carica* L. realizado bajo las siguientes condiciones: HPLC en fase reversa en un Modulo de Separación 2695 equipado con un auto inyector, un detector fotodiodo y un software. La data espectroscópica se leyó entre 200 y 700 nm, usando una columna C18 y una columna de 4,6 nm x 2,0 nm para la separación de las antocianinas a 40 °C.

En la figura se observan los tiempos de retención de dos antocianinas que según la literatura se refieren a 1) Cianidina 3-glucósido y 2) Cianidina 3-ramnoglucósido.

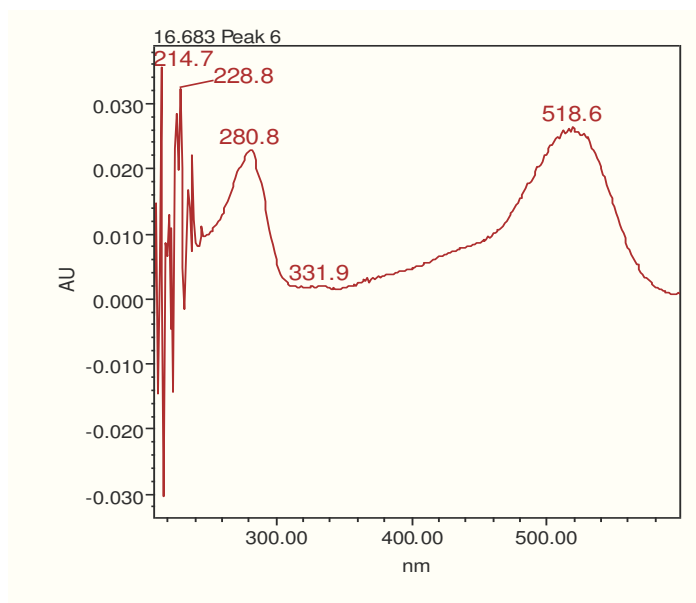


Figura Nº 18: En la presente figura se advierte el barrido espectrofotométrico de la banda 1) del *Ficus carica* L. correspondiente a Cianidina 3-glucósido.

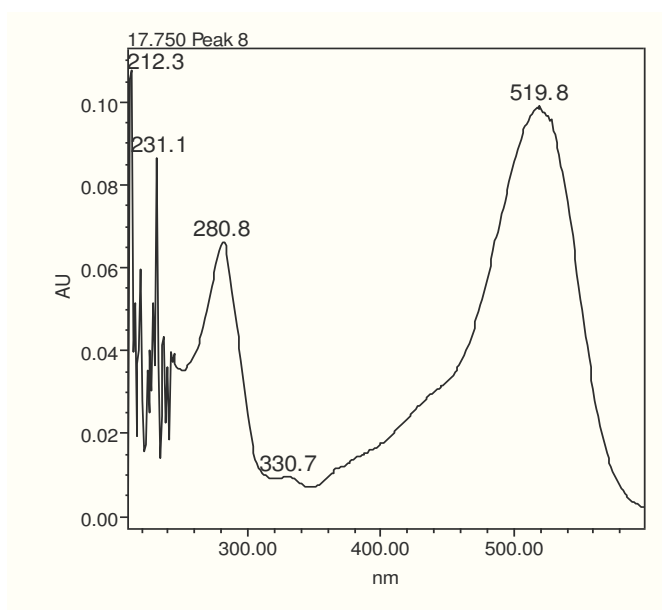


Figura Nº 19: En la figura se advierte el barrido espectrofotométrico de la banda 2) de *Ficus carica* L. correspondiente a Cianidina 3-ramnoglucósido ⁽⁵⁹⁾.

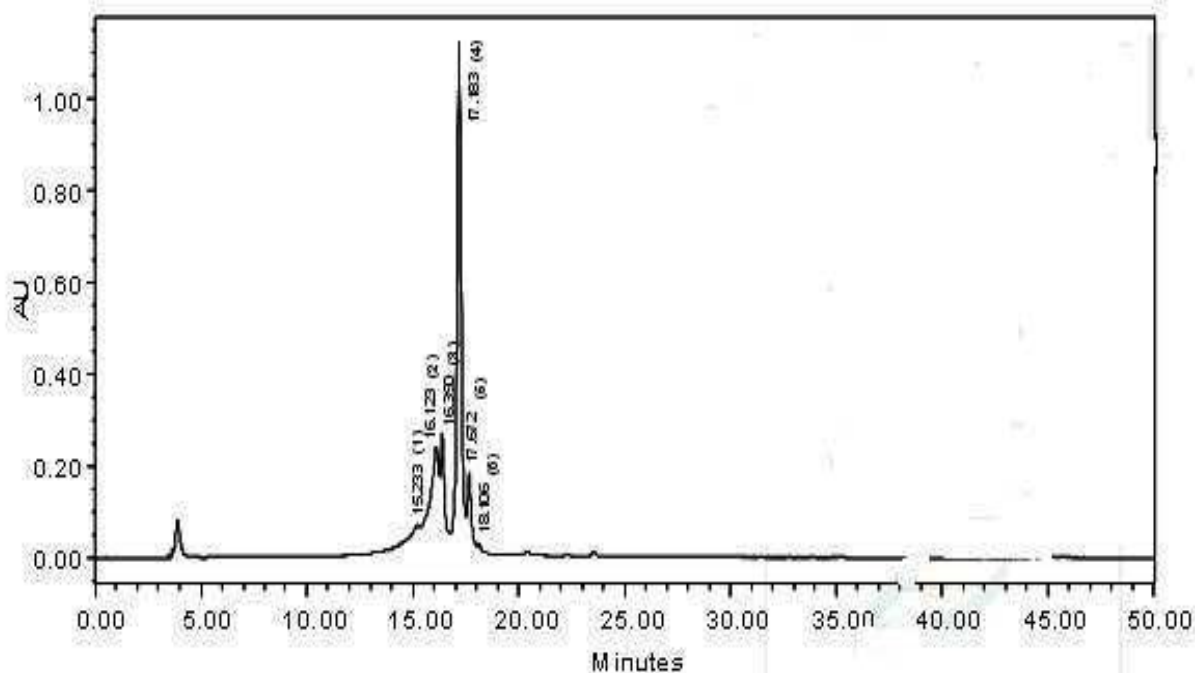


Figura Nº 20: Cromatograma HPLC de las antocianinas de *Prunus domestica*

L. realizada bajo las siguientes condiciones: HPLC en fase reversa en un Modulo de Separación 2695 equipado con un auto inyector, un detector fotodiodo y un software. La data espectroscópica se leyó entre 200 y 700 nm, usando una columna C18 y una columna de 4,6 nm x 2,0 nm para la separación de las antocianinas a 40 °C.

En la figura se observan los tiempos de retención de seis antocianinas que según la literatura se refieren a 1) no identificado, 2) Cianidina 3-xilosido, 3) cianidina 3-glucósido, 4) Cianidina 3-rutinósido, 5) Peonidina 3-glucósido y 6) Peonidina 3-rutinósido.

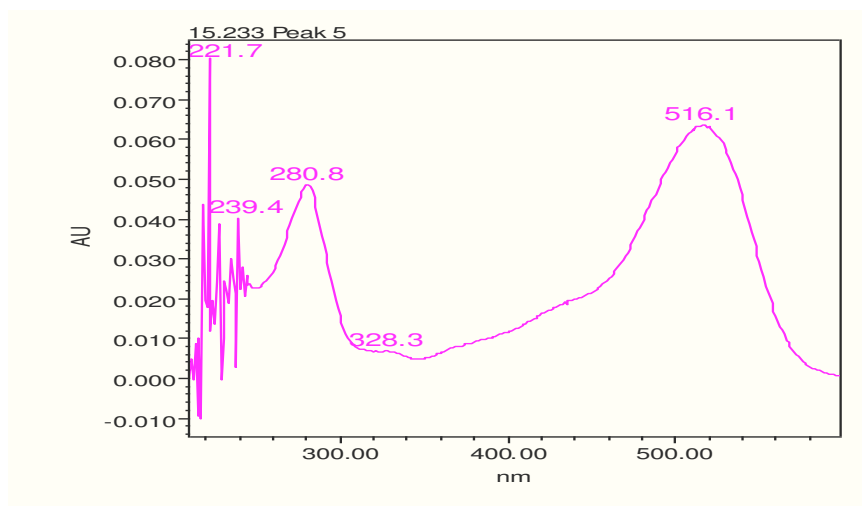


Figura Nº 21: Barrido espectrofotométrico de la banda 1) de *Prunus domestica* L. correspondiente a una antocianina no identificada.

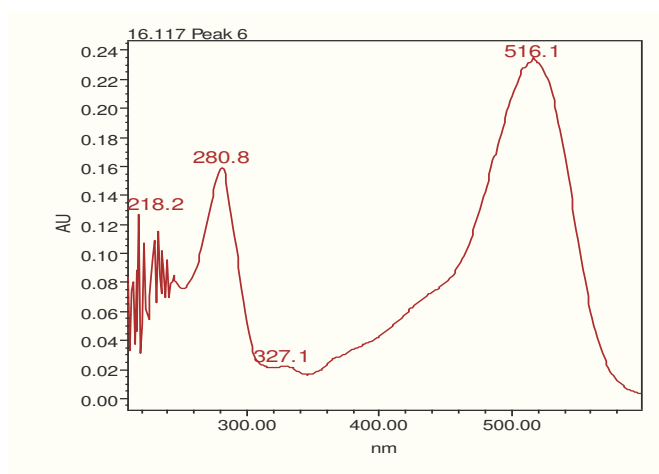


Figura Nº 22: Barrido espectrofotométrico de la banda 2) de *Prunus domestica* L. correspondiente a cianidina 3-xilosido

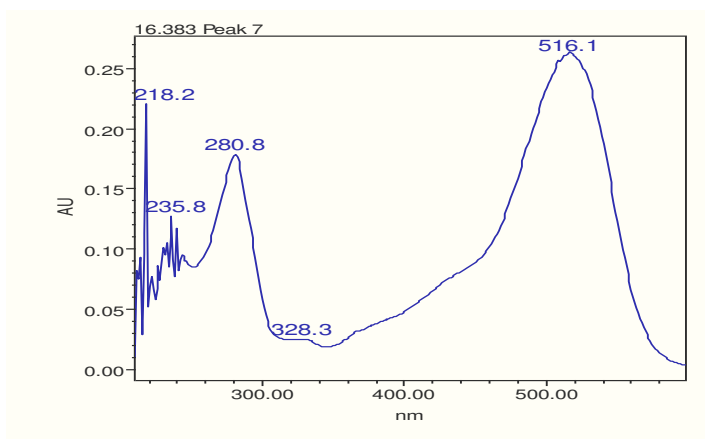


Figura Nº 23: Barrido espectrofotométrico de la banda 3) de *Prunus domestica* L. correspondiente a cianidina 3-glucósido.

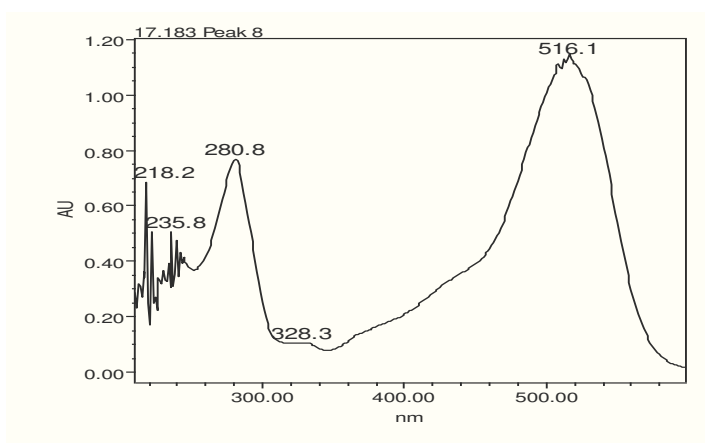


Figura Nº 24: Barrido espectrofotométrico de la banda 4) de *Prunus domestica* L. correspondiente a cianidina 3-rutinosido.

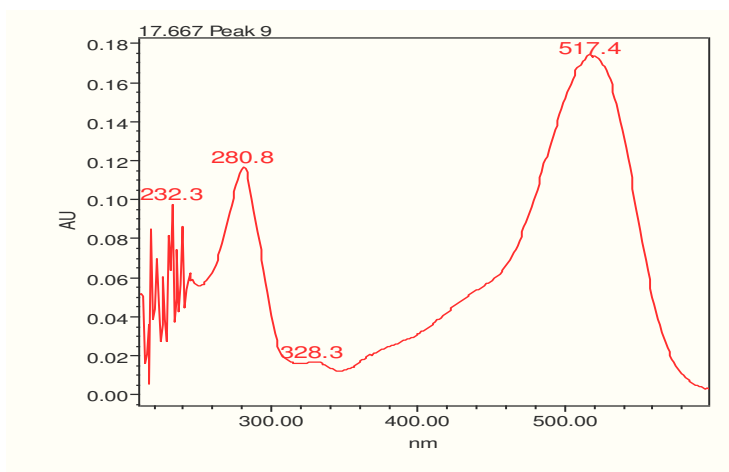


Figura Nº 25: Barrido espectrofotométrico de la banda 5) de *Prunus domestica* L. correspondiente a Peonidina 3-glucósido.

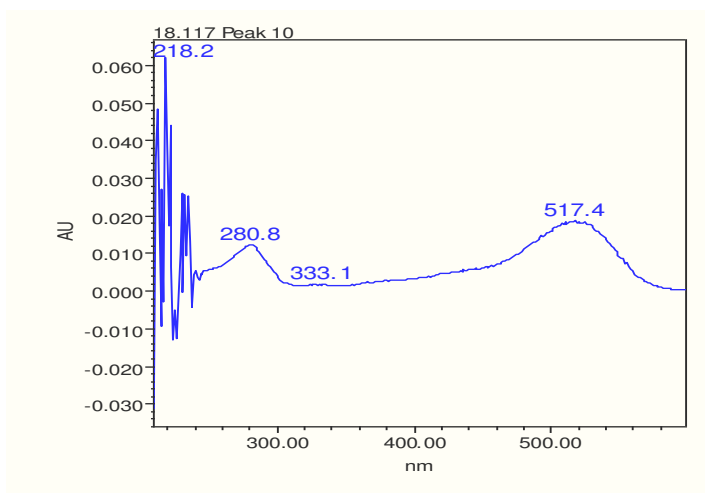


Figura Nº 26: Barrido espectrofotométrico de la banda 6) de *Prunus domestica* L. correspondiente a Peonidina 3-rutinósido ⁽⁶⁰⁾.

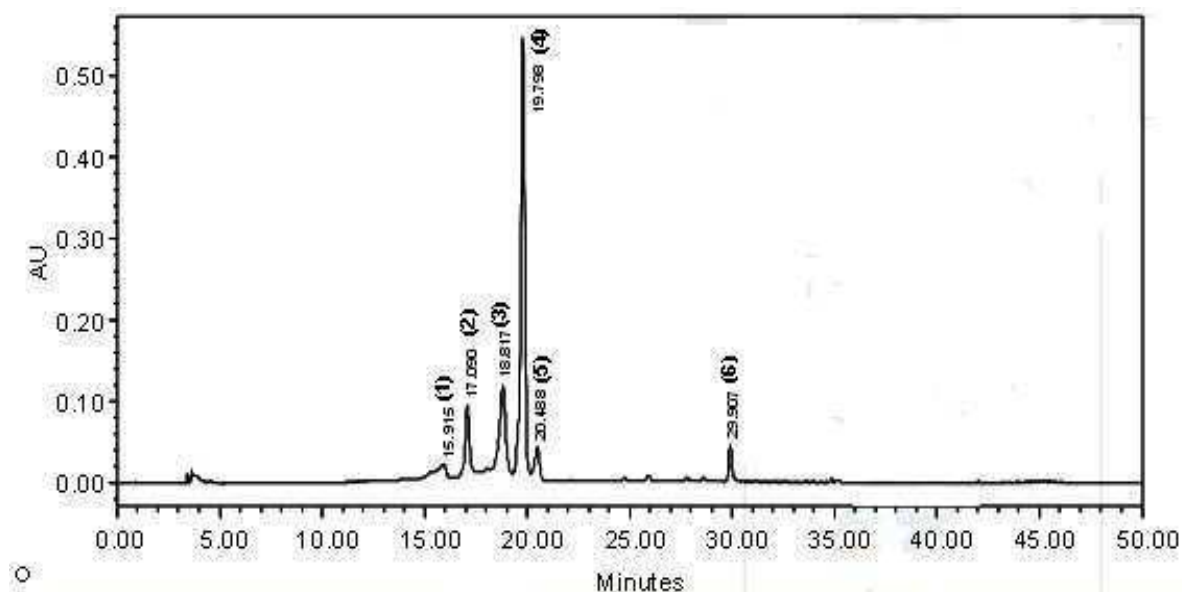


Figura N° 27: Cromatograma HPLC de las antocianinas de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” realizada bajo las siguientes condiciones: HPLC en fase reversa en un Modulo de Separación 2695 equipado con un auto inyector, un detector fotodiodo, y un software. La data espectroscópica se leyó entre 200 y 700 nm, usando una columna C18 y una columna de 4.6 nm x 2.0 nm para la separación de las antocianinas a 40 °C.

En la figura se observan los tiempos de retención de seis antocianinas que según la literatura corresponden a 1) Delfinidina 3-glucósido, 2) Cianidina 3-glucósido, 3) Petunidina 3-glucósido, 4) Peonidina 3-glucósido, 5) Malvidina 3-glucósido y 6) Antocianina no identificada.

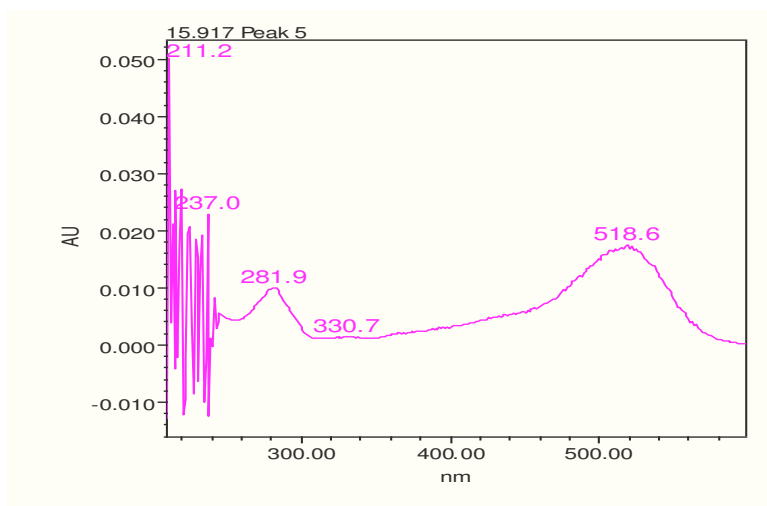


Figura Nº 28: Barrido espectrofotométrico de la banda 1) de *Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe" correspondiente a Delfinidina 3-glucósido.

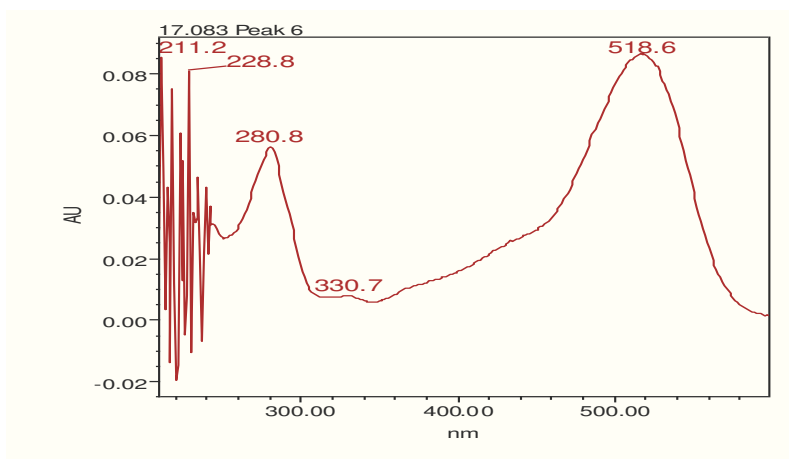


Figura Nº 29: Barrido espectrofotométrico de la banda 2) de *Vitis vinifera* L. c.v. "Red Globe" correspondiente a Cianidina 3-glucósido.

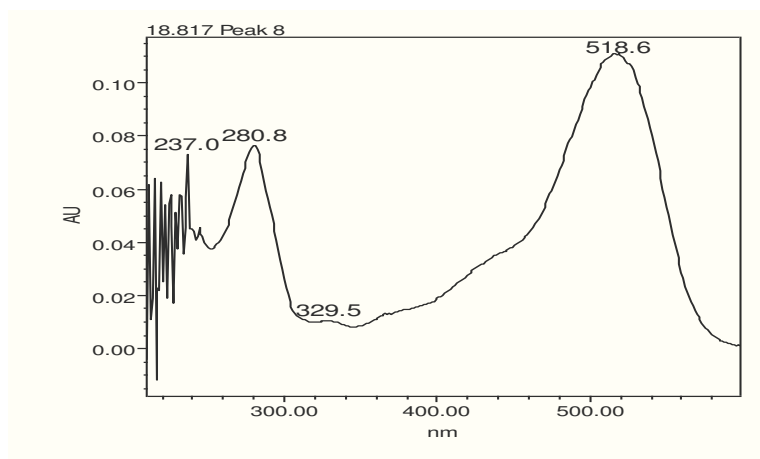


Figura Nº 30: Barrido espectrofotométrico de la banda 3) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” correspondiente a Petunidina 3-glucósido.

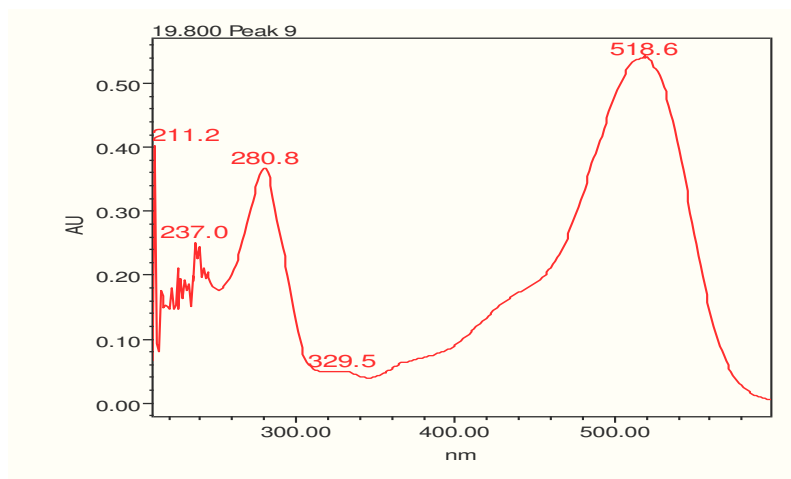


Figura Nº 31: En la presente figura se advierte el barrido espectrofotométrico de la banda 4) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” correspondiente a Peonidina 3-glucósido.

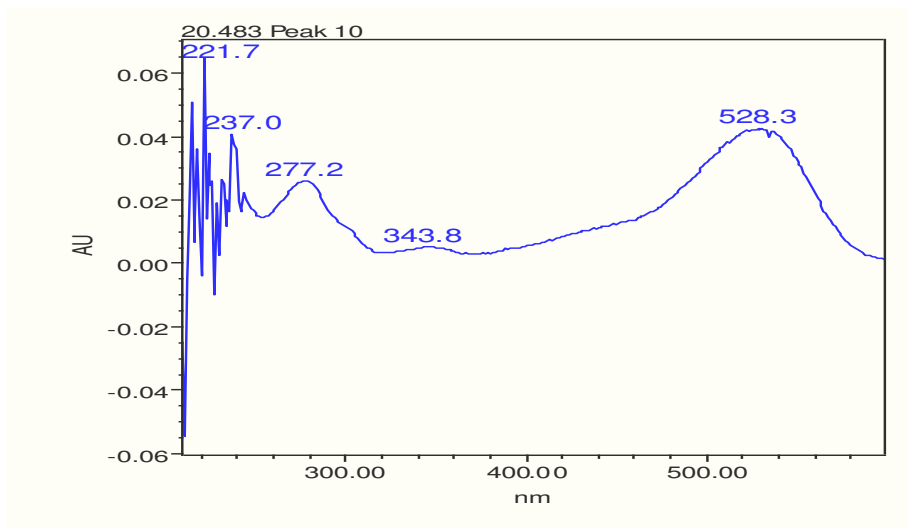


Figura Nº 32: Barrido espectrofotométrico de la banda 5) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” correspondiente a Malvidina 3-glucósido.

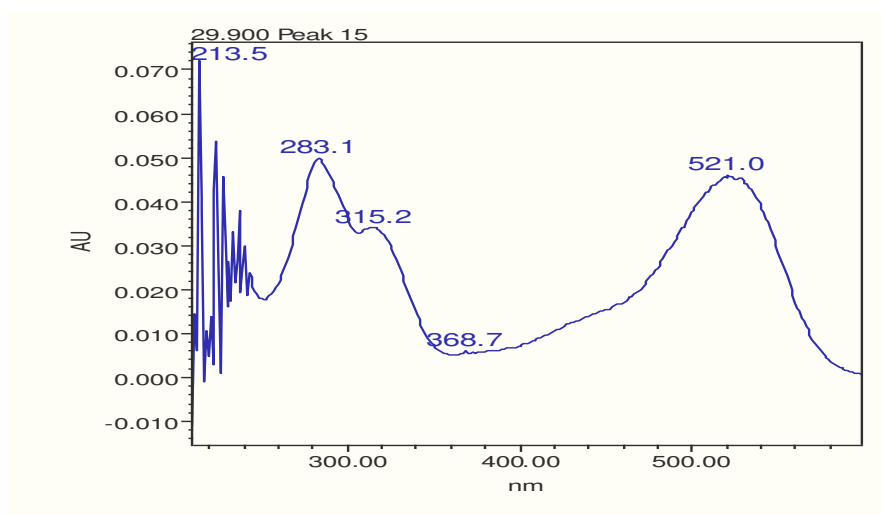


Figura Nº 33: En la presente figura se advierte el barrido espectrofotométrico de la banda 6) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” correspondiente a una antocianina no identificada ⁽⁶¹⁾.

Cuantificación de las antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial

$$\text{Pigmento de antocianinas monoméricas (mg/100g)} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times 1}$$

PM es el peso molecular.

FD es el factor de dilución que es 240.

ϵ es la absortividad molar.

El ϵ de la cianidina 3-glucósido es 26,900 y el PM es 449.2.

Tabla N° 10: Concentración de las antocianinas monoméricas del *Ficus carica* L. por el método del pH diferencial. Se indican los resultados de las absorbancias a 520 nm y 700 nm a pH 1,0 y 4,5 respectivamente.

	pH 1,0		pH 4,5		Antocianinas monoméricas (mg/100g)
	520 nm	700 nm	520 nm	700 nm	
Higo	0,095	0,004	0,015	0,001	30,84
	0,088	0,003	0,011	0,001	29,64
	0,085	0,003	0,010	0,001	29,64

Antocianinas monoméricas (mg/100g)_{promedio}: 30,09 mg/100g

Tabla N° 11: Concentración de las antocianinas monoméricas de *Prunus domestica* L. por el método del pH diferencial.

Se indican los resultados de las absorbancias a 520 nm y 700 nm a pH 1,0 y 4,5 respectivamente.

	pH 1,0		pH 4,5		Resultado
	520 nm	700 nm	520 nm	700 nm	
Ciruela	0,347	0,009	0,016	0,002	40,15
	0,348	0,002	0,018	0,002	39,92
	0,348	0,002	0,024	0,002	39,70

Antocianinas monoméricas (mg/100g)_{promedio}: 39,92

Tabla N° 12: Concentración de las antocianinas monoméricas de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” por el método del pH diferencial.

Se indican los resultados de las absorbancias a 520 nm y 700 nm a pH 1,0 y 4,5 respectivamente.

	pH 1,0		pH 4,5		Resultado
	520 nm	700 nm	520 nm	700 nm	
Uva	0,174	0,002	0,001	0,003	21,16
	0,178	0,002	0,007	0,002	20,56
	0,139	0,003	0,00	0,00	20,92

Antocianinas monoméricas (mg/100g)_{promedio}: 21,28.

Tabla N° 13: Tabla comparativa de la concentración de las antocianinas monoméricas expresadas en Cy 3-glu (mg/100g) por el método del pH diferencial.

	Concentración de antocianinas monoméricas Cy 3-glu (mg/100g)
<i>Prunus domestica</i> L. “Ciruela”	39,92
<i>Ficus carica</i> L. “Higo”	30,09
<i>Vitis vinifera</i> L. c.v. “Red Globe” “Uva red globe”	21,28

■ Ensayos biológicos

Tabla 14: Resultados de las lecturas espectrofotométricas y porcentaje de captación de radicales libres de la especie vegetal *Prunus domestica* L.

Muestra	Concentrac. ug/ml	Absorb.	Absorb. Promedio	Absorb. Blanco Muestra	Absorb. Neta	% Captacion Radicales libres
DPPH	0	0.067 0.07 0.059 0.058	0.064			
	50	0.063	0.063	0.011	0.052	18.11
	75	0.065 0.065	0.065	0.014	0.051	19.69
	100	0.06 0.061	0.061	0.018	0.043	33.07
DPPH	0	0.08	0.08			
	150	0.051	0.051	0.005	0.046	42.5
	225	0.049	0.049	0.006	0.043	46.25
	300	0.048	0.048	0.007	0.041	48.75
	600	0.055	0.055	0.015	0.04	50

Tabla 15: Porcentaje de captación de radicales libres e IC50 µg/mL de la especie vegetal *Prunus domestica* L.

Concentrac. ug/ml	Absorban. Neta	Porcent. Captac. Radical. Libres	IC50 ug/ml
50	0.052	18	
75	0.051	20	
100	0.043	33	
150	0.046	43	13.25
225	0.043	46	
300	0.041	49	
600	0.04	50	



Figura Nº 34: En la presente figura se muestra los porcentajes de capacidad antioxidante expresado en porcentaje de captación de radicales libres de la muestra de *Prunus domestica L.*

Tabla Nº 16: Resultados de las lecturas espectrofotométricas y porcentaje de captación de radicales libres de la especie vegetal *Ficus carica L.*

Muestra	Concentrac. ug/ml	Absorb.	Absorb. Promedio	Absorb. Blanco Muestra	Absorb. Neta	% Captacion Radicales libres
DPPH	0	0.067 0.07 0.059 0.058	0.064			
	50	0.059 0.063 0.061	0.061	0.01	0.051	19.69
	75	0.058 0.058 0.057	0.058	0.015	0.043	33.07
	100	0.053	0.053	0.017	0.036	43.31
DPPH	0	0.08	0.08			
	150	0.064	0.064	0.028	0.036	55
	225	0.071 0.069	0.07	0.036	0.034	57.5
	300	0.075 0.073	0.074	0.042	0.032	60
	600	0.093 0.091	0.092	0.067	0.025	68.75

Tabla N° 17: Porcentaje de captación de radicales libres e IC50 ug/mL de la especie vegetal *Ficus carica* L.

Concentrac. ug/ml	Absorban. Neta	Porcent. Captac. Radical. Libres	IC50 ug/ml
50	0.051	20	
75	0.043	33	
100	0.036	43	
150	0.036	55	8.5
225	0.034	58	
300	0.032	60	
600	0.025	69	

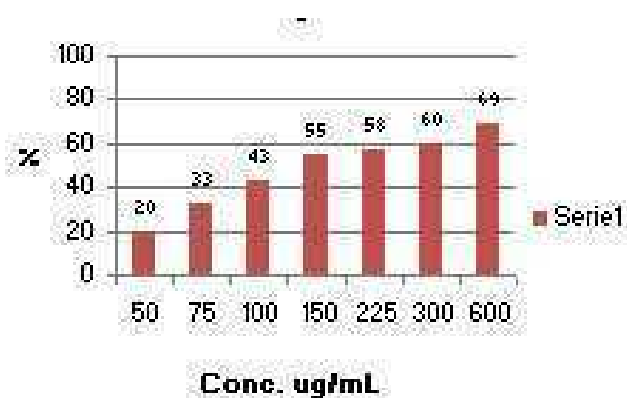


Figura 35: En la figura se muestra los porcentajes de capacidad antioxidante expresado en porcentaje de captación de radicales libres de la muestra de *Ficus carica* L.

Tabla N° 18: Resultados de las lecturas espectrofotométricas y captación de radicales libres de la especie vegetal *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe”.

Muestra Uva	Concentrac. ug/ml	Absorb.	Absorb. Promedio	Absorb. Blanco Muestra	Absorb. Neta	% Captacion Radicales libres
DPPH	0	0.166 0.162	0.164			
	75	0.136 0.137	0.137	0.006	0.131	20.43
	150	0.109 0.113	0.111	0.007	0.104	36.59
	225	0.096 0.095	0.096	0.008	0.088	46.65
	300	0.084 0.084	0.084	0.009	0.075	54.27
	600	0.057 0.066	0.062	0.013	0.049	70.43

Tabla N° 19: Porcentaje de captación de radicales libres e IC50 ug/mL de la especie vegetal *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe”.

Concentrac. ug/ml	Absorban. Neta	Porcent. Captac. Radical. Libres	IC50 ug/ml
75	0.131	20	
150	0.104	37	
225	0.088	47	3.87
300	0.075	54	
600	0.049	70	

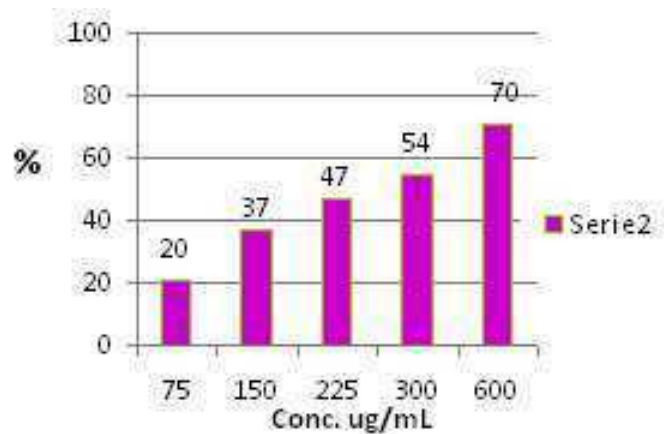


Figura 36: En la presente figura se muestra los porcentajes de capacidad antioxidante expresado en porcentaje de captación de radicales libres de la muestra de *Vitis vinifera* L c.v. "Red Globe".

Tabla N° 20: Tabla comparativa de la capacidad antioxidante IC50 de los frutos de *Ficus carica* L, *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe” y *Prunus domestica* L.

Muestra Problema	Capacidad Antioxidante IC50 (ug/mL)
α -Tocoferol (Trolox)	1,80
Ácido ascórbico (Vitamina C)	2,02
<i>Vitis vinifera</i> L. c.v. “Red Globe” “Uva red globe”	3,87
<i>Ficus carica</i> L. “Higo”	8,50
<i>Prunus domestica</i> L. “Ciruela”	13,25

Tabla N° 21: Tabla comparativa resumen de las pruebas químicas y biológicas de los frutos de *Ficus carica* L, *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe” y *Prunus domestica* L.

	Antocianinas presentes según (HPLC) (Figura 17, 20 y 27)	Índice de color (IC)	Cuantificación de antocianina Cy 3-glu (mg/100g)	Capacidad antioxidante IC50 (µg/mL)
<i>Vitis vinifera</i> L. c.v. “Red Globe” “Uva red globe”	Peonidina Petunidina Cianidina Malvidina Delfinidina	177,22	21,28	3,87
<i>Prunus domestica</i> L. “Ciruela”	Cianidina Peonidina	164,52	39,92	13,25
<i>Ficus carica</i> L. “Higo”	Cianidina	53,04	30,09	8,50

V. DISCUSIÓN

El extracto metanólico de los frutos de *Prunus domestica* L., *Ficus carica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” demostró buena solubilidad en solventes polares tales como el alcohol etílico y metílico en medio ácido para estabilizar al ión oxonio del núcleo heterocíclico de la antocianina.

Mediante ensayos cromatográficos en papel, en escala preparativa y empleando como fase móvil el BAW que, es un sistema de solventes de alta polaridad, se aislaron las antocianinas (Figura N° 10, 11 y 12); las bandas fueron eluídas con ácido clorhídrico al 0,01% en metanol, esta solución fue analizada con el espectrofotómetro uv-visible (Tabla N° 7, 8 y 9).

Según la literatura, los resultados observados no son concluyentes por lo que se sugiere contrastarlos con HPLC. Al someter la muestra a cromatografía por HPLC se advierte que en la muestra de higo de encuentran la cianidina 3-glucósido y cianidina 3-ramnoglucósido; en la muestra de ciruela la cianidina 3-xylósido, cianidina 3-glucósido, cianidina 3-rutinósido, peonidina 3-glucósido y peonidina 3-rutinósido; mientras que en la uva se encontró la **delfinidina** 3-glucósido, cianidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido (Figura 17, 20 y 27).

Al respecto, Wang H y Col, 1997³⁰ refieren que en la uva están presentes las antocianinas delfinidina glicosilada, cianidina glicosilada y malvidina glicosilada. Posiblemente, la inexistencia de las antocianinas petunidina y peonidina glicosiladas en la muestra de uvas de Wang radique en el hecho de tratarse de una variedad diferente; así pues, nuestra muestra pertenece a la variedad ***Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”** mientras que la de Wang y Col ³⁰ a la variedad **Carménère**.

La cuantificación de las antocianinas mostró que la ciruela presentaba una concentración de antocianinas totales (mg/100g) de 39,92, el higo de 30,09 y la uva de 21,28.

Al respecto, Burin B y Col, 2010 ³¹ indican que las ciruelas presentan un contenido de antocianinas totales (mg/100g) de 2 a 25; mientras que las uvas entre 6 y 600.

De los resultados proporcionados por Burin se advierte que los frutos de uva estudiados se encuentran en el mencionado rango de concentración; mientras que la ciruela presenta un rendimiento ligeramente mayor posiblemente debido a la calidad del suelo, el periodo de cosecha, el clima, entre otros.

Con la finalidad de determinar la actividad biológica de las antocianinas se determinó la capacidad antioxidante de los frutos, encontrándose que la uva presenta una IC₅₀ (µg/mL) de 3,87, el higo una IC₅₀ (µg/mL) de 8,50 y la ciruela una IC₅₀ (µg/mL) de 13,25, que significa que la uva tiene mayor poder antioxidante.

De la Tabla N° 21 se observa que la *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” presenta mayor índice de color y capacidad antioxidante (IC₅₀); sin embargo, se advierte baja concentración de antocianinas debido a que la cuantificación se realizó en base a cianidina 3-glucósido (que es la antocianina mas frecuente en los frutos) siendo la peonidina la antocianina presente en mayor cantidad en dicho fruto tal como se evidencia en la Figura N° 27.

De *Prunus domestica* L. y *Ficus carica* L. se advierte que el índice de color y la concentración de antocianinas es proporcional; es decir, a mayor color rojo el contenido de antocianinas es mayor.

De *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” se advierte que presenta las antocianinas peonidina, petunidina y malvidina. Dichas antocianinas estructuralmente presentan metoxilación, lo que se evidencia en la coloración roja de los frutos y es ratificado por el índice de color encontrado.

Tal como fue demostrado, la *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” presenta la mayor capacidad antioxidante (IC₅₀ 3,87 µg/mL), estando asociada la actividad antioxidante a las antocianinas y la prevención de la proliferación de células cancerígenas, protección contra enfermedades del corazón, entre otras.

Por lo tanto, las antocianinas son consideradas potencialmente beneficiosas como integrantes de la dieta humana.

VI. CONCLUSIONES

1. En el fruto de *Prunus domestica* L. se identificaron cinco antocianinas: cianidina 3-xylósido, cianidina 3-glucósido, cianidina 3-rutinósido, peonidina 3-glucósido y peonidina 3-rutinósido.

En el fruto de *Ficus carica* L. se identificaron dos antocianinas: la cianidina 3-glucósido y la cianidina 3-ramnoglucósido.

En el fruto de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” se identificaron cinco antocianinas: delphinidina 3-glucósido, cianidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido y malvidina 3-glucósido.

2. La cuantificación de antocianinas monoméricas totales (expresado en mg de cianidina 3-glucósido/100g) de *Prunus domestica* L. fue de 39,92, de *Ficus carica* L. de 30,09 y el de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” de 21,28.

3. La capacidad antioxidante expresada en IC50 (µg/mL) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” fué de 3,87, de *Ficus carica* L. de 8,50 y *Prunus domestica* L. de 13,25.

4. El índice de color (IC) de *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe” fue de 177,22, de *Ficus carica* L. de 53,04 y *Prunus domestica* L. de 164,52.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. López G. Guía de los árboles y arbustos de la península ibérica y baleares. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 2004
2. Roesler R. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2007; 27(1):53-60
3. Parra A., Hernández J., Camacho J. Estudio fisiológico poscosecha y evaluación de la calidad de la ciruela variedad Horvin (*Prunus domestica* L.) bajo tres condiciones de almacenamiento refrigerado. Ing. Investig. 2008;1: 99-104.
4. Nuñez E. Plantas medicinales de Puerto Rico. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. San Juan de Puerto Rico.1982.
5. Repo R., Encina C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. Rev. Soc. Quím. 2008; 74(2):108-124.
6. Fonnegra R., Jimenez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín. 2007.
7. García L., García V., Rojo D., Sánchez E. Plantas con propiedades antioxidantes. Rev. Cub. Invest. Bioméd. 2001; 20(3):231-235.
8. Ortega R., Basabe B., Lopez A. Frutas, hortalizas y verduras. En: Frutas, verduras y salud. Elsevier. Barcelona.2004.
9. Herran O., Prada G., Quintero D. Ingesta usual de vitaminas y minerales en Bucaramanga, Colombia. Rev. Chil. Nutr. 2007;34(1):1-5.
10. Kuskoski M., Asuero A., Troncoso A., Manzini Filho J. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc. Tecnol. Aliment. 2005; 25(4):1-9.
11. Bolivar N., Saucedo C., Solis S., Sauri E. Maduración de frutos de saramuyo *Annona squamosa* L. desarrollados en Yucatan, Mexico. 2009; 43(2):133-141.
12. Vicente C. Fisiología vegetal. Editorial H1B. Madrid. 1976.
13. Jimenez M., Zambrano M., Aguilar, M. Estabilidad de Pigmentos en frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. Inf. tecnol., 2004; 15(3):1-6.

14. Vignoni L., Cesari R., Forte M., Mirabile M. Determinación de índice de color en ajo picado. Inf. Tecnol. 2006; 17(6): 63-67.
15. Cook N., Samman S. Flavonoids: Chemistry, Metabolism, Cardioprotective effects, and Dietary Sources. J. Nutr. Biochem. 2006;7:66-67.
16. Martinez-Valverde I., Periago M., ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Arch. Latin. Nutric. 2007;50:5-18.
17. Muñoz O. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos en mieles chilenas e índice antioxidante. Quim. Nova. 2007; 30(4): 848-851.
18. Avello M., Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea. 2006; 4(1):161-172.
19. Mesa A., Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en algunas especies del género *Calophyllum*. Rev. Cub. Plant. Med. 2010; 15(2):13-26.
20. Puertas M., Gomez L., Saenz J. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. Rev Cubana Plant Med. 2009; 14(2):1-5
21. Murillo E., Lombo O., Tique M., Mendez J. potencial antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms. Inf.tecnol. 2007;18(6):65-74.
22. Duran D., Trujillo Y. Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados. Vitae. 2008; 15(1):1-9.
23. Malacrida C., Da Mota S. Compuestos fenólicos totales y antocianinas en jugo de uvas. Cienc. Tecnol. Aliment. 2005. 25(4):659-664.
24. Lock O. Antocianinas. En: Colorantes alimentarios. PUCP, Fondo Editorial. Lima. 1997.
25. Jackman R., Smith J. Anthocyanins and betalains. Natural Food Colorants. Edición. Blackie & Son Ltd. Gran Bretaña. 1992.
26. Rockenbach I., Lessa G., Rodriguez E. Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape ***Vitis vinifera*** bagasse extracts from *Tannat* and *Ancelota* - different varieties of ***Vitis vinifera*** varieties. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2008; 28 (1):1-4.
27. Garzón G. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. Acta Biol. Colomb. 2008;3:27-36.
28. Francis L. Anthocyanins. En: Current Aspect of food colorants. Furia, T. Editorial CRC Press. Massachussets. 1978.

29. Remesy C., Manach C., Demogne C., Texier O., Regerat F. Intereret nutritionnal des flavonoides. Med. Et Nutr. 2006; 32(1):17-27.
30. Wang H., Cao G., Prior R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agric. Food Chem. 1997; 45(2):304-309.
31. Burin B., Falcao L., Valdemoro L. Color, contenido fenólico y actividad antioxidante del jugo de uva. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2010; 30 (4):1-6.
32. Fredes C. Antioxidantes en berries nativos chilenos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. 2009; 8(6):469-478.
33. Gauche C., Da Silva E., Bordignon M. Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. Sci. Agric. 2010; 67 (1):1-4.
34. Jimenez M., Zambrano M., Aguilar M. Estabilidad de Pigmentos en Frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. Inf. Tecnol. 2004; 15(3).
35. Márquez L., Torres F., Pretell C. Antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de frutas. Puebl. Cont. 2007; 18(2):209-214.
36. Ferreira E., Stringheta P., Cano M. Stability of anthocyanin in spinach vine **Basella rubra** fruits. Cienc. Inv. Agr. 2007; 34(2):115-120.
37. Gutierrez A., Ledesma L., Garcia I., Grajales O. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. Rev Cubana Salud Pública. 2007; 33(1): 1-6.
38. Gonzalez K. Efecto antioxidante y contenido polifenólico de **Syringodium filiforme**. Rev. Biol. Trop. 2011; 59(1): 465-472.
39. Villanueva J., Condezo L., Ramirez E. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu **Myrciaria dubia (H.B.K) McVaugh**. Cienc. Tec. Alim. 2010; 30(11):1-10
40. Ramos F., Muñoz A., Alvarado C., Yañez J. Antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidante de sachapapa morada **Dioscorea trifida L.** y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. Rev. Soc. Quim. Perú. 2010; 76(1):61-72.
41. Lima L., Melo E., Lima D. Efeito da luz e da temperatura de congelamento sobre a estabilidade de das antocianinas da pitanga roxa. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2005; 25(1): 92-94.

42. Marco P., Poppi R., Scarminol. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. Quím. Nova. 2008; 31(5):1218-1223.
43. Vargas G., Soto R., Rodríguez M. Análisis preliminar de antocianinas en frutos de icacao ***Chrysobalanus icacao* L.** Rev. Fitotec. Mex. 2002; 25(3):261-264.
44. Repo R., Encina C. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua ***Chenopodium quinoa***, kañiwa ***Chenopodium pallidicaule*** y kiwicha ***Amaranthus caudatus***. Rev. Soc. Quim. Perú. 2008; 74(2):1-8.
45. Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades producidas por radicales libres. Rev. Panam. Salu. Public. 1997; 1(5):399-400.
46. Ferramola A., Sancovich H. Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel. Rev. Argent. Dermatol. 2006; 87(2):113-120.
47. Ferrer Y., Martínez G., Leroy D. El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. Rev. Cub. Farm. 2009; 43(3):1-5.
48. Zorrilla A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. Rev. Cub. Invest. Biomed. 2002; 21(3):234-237.
49. Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cub. Med. Milit. 2002; 31(2):126-136.
50. Gutierrez A., Ledesma L., García I., Grajales O. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. Rev. Cub. Salu. Public. 2007; 33(1):1-4.
51. Santamaría F., Díaz R., Sauri E., Espadas y Gil F., Santamaría J., Larque A. Características de calidad de frutos de papaya maradol en la madurez de consumo. Agric. Tecn. Mex. 2009; 35(3):347-353.
52. Quintero C. Efecto de la copigmentación sobre el color y la estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Editorial Universidad de la Ameritas. Puebla. 2004.
53. Díaz L., Padilla C., Sepúlveda C. Identificación del principal pigmento presente en la cáscara del maracuyá púrpura ***Pasiflora edulis***. Inf. Tec. 2006;17(6):75-84.

54. Muñoz C., Maihua R., Peralta F., Tereschuk M., Gonzalez M., Albarracin P. Análisis de antocianinas en arándanos del Noa ***Vaccinium corymbosum L.*** Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología. Universidad Nacional de Tucuman; 2007.
55. Chirinos R., Campos D., Betalleluz I., Giusti M., Schwartz S., Pedreschi R. High-performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD)/HPLC-mass spectrometry (MS) profiling of anthocyanins from Andean Mashua Tubers (***Tropaeolum tuberosum*** Ruíz and Pavón) and their contribution to the overall antioxidant activity. J. Agric. Food. Chem. 2006; 54(19):7089-7097.
56. Pasto D., Johnson C. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté S.A. Barcelona. 2003.
57. Del Carpio C., Serrano C., Giusti M. Caracterización de las antocianinas de los frutos de ***Berberis boliviana Lechler***. Rev. Soc. Quim. Perú. 2009; 75(1): 76-86.
58. Ramos E., Castañeda B., Ibañez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. Red. Acad. Perú. Salud. 2008; 15(1):42-46.
59. Del Caro A., Piga A. Polyphenol composition of peel and pulp of two italian fresh fig fruits cultivars ***Ficus carica L.*** Eur. Food. Res. Technol. 2008; 226: 715-719.
60. Usenik V., Stampar F., Veberic R. Anthocyanins and fruti colour in plums (***Prunus domestica L.***) during ripening. Food Chemistry. 2009; 114:529-534.
61. Del Valle G., Gonzalez A., Baez R. Antocianinas en uva ***Vitis vinifera L.*** y su relación con el color. Rev. Fitot. Mex. 2005; 28(4):359-368.

VIII. ANEXOS

Número 1: Clasificación realizada en la UNALM¹



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
TELÉFONO: 348 5669 FAX: 348 5647 - APDO. 1256 - LA MOLINA-LIMA-PERU



La Molina, 2 de diciembre, 2010

CONSTANCIA

Se informa a través de la presente que los especímenes remitidos por la Sra. Gianinna Márquez Mendoza, conocidos como "vid", "higuera" y "ciruelo", han sido estudiados para su determinación taxonómica en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL). El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo, en tales muestras permiten concluir que las mismas corresponden a la las especies *Vitis vinifera* L., *Ficus carica* L. y *Prunus domestica* L.

A continuación se adjuntan los cuadros con la sistemática de las especies identificadas conforme a Cronquist y The Angiosperm Phylogeny Group (APG III).




Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel
Jefe Herbario de la Facultad de Ciencias (MOL)
Universidad Nacional Agraria La Molina

1. Sistemática de la "vid", *Vitis vinifera* de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Rhamnales
Familia	: Vitaceae
Género	: <i>Vitis</i>
Especie	: <i>Vitis vinifera</i> L.
Cultivar	: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. 'Red Globe'

2. Sistemática de la "vid" de acuerdo a la APG III (2009)

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Eudicotiledóneas
Clado	: Rosidas
Orden	: Vitales
Familia	: Vitaceae
Género	: <i>Vitis</i>
Especie	: <i>Vitis vinifera</i> L.
Cultivar	: <i>Vitis vinifera</i> L. cv. 'Red Globe'

3. Sistemática de la "higuera" de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Hamamelidae
Orden	: Urticales
Familia	: Moraceae
Género	: <i>Ficus</i>
Especie	: <i>Ficus carica</i> L.

4. Sistemática de la "higuera" de acuerdo a la APG III (2009)

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Eudicotiledóneas
Clado	: Rosidas
Orden	: Rosales
Familia	: Moraceae
Género	: <i>Ficus</i>
Especie	: <i>Ficus carica</i> L.

5. Sistemática del "ciruelo" de acuerdo a Cronquist (1981)

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Rosales
Familia	: Rosaceae
Subfamilia	: Prunoideae
Género	: <i>Prunus</i>
Especie	: <i>Prunus domestica</i> L.

6. Sistemática del "ciruelo" de acuerdo a la APG III (2009)

Reino	: Plantae
Clado	: Angiospermas
Clado	: Eudicotiledóneas
Clado	: Rosidae
Orden	: Rosales
Familia	: Rosaceae
Subfamilia	: Prunoideae
Género	: <i>Prunus</i>
Especie	: <i>Prunus domestica</i> L.

Número 2: Espectros UV-visible de la antocianinas de los frutos *Ficus carica* L., *Prunus domestica* L. y *Vitis vinifera* L. c.v. “Red Globe”.

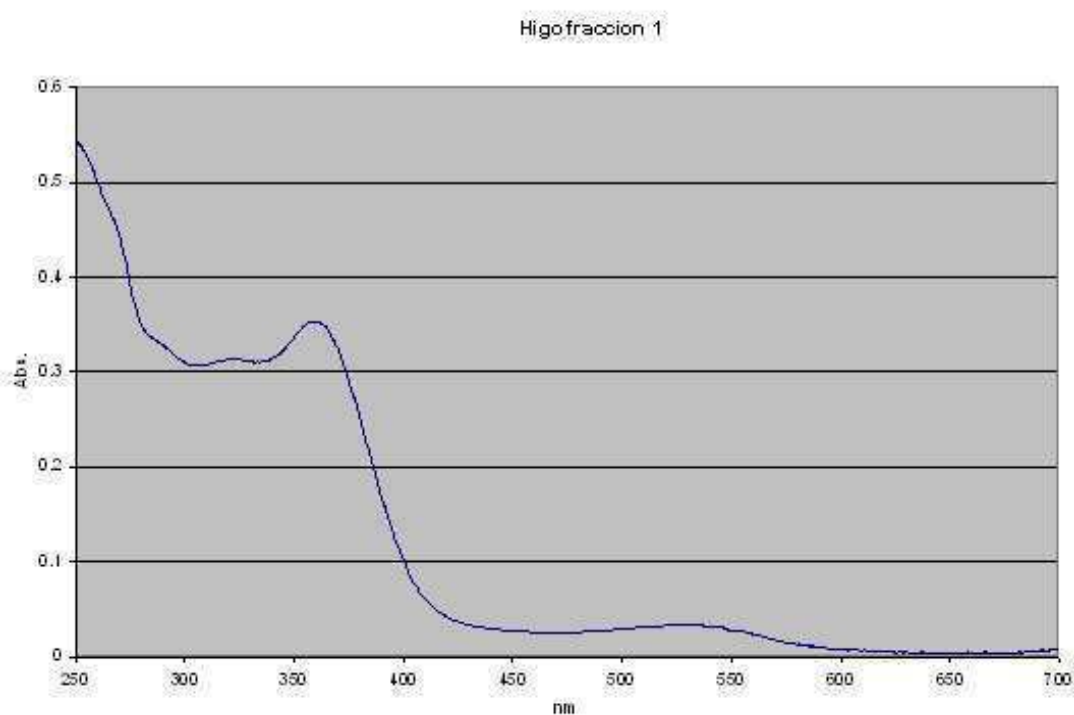


Figura N° 37: Espectro UV-visible de la banda 1 de *Ficus carica* L. (Tabla 7).
No presenta el E440/Emax característico de una antocianina conocida.

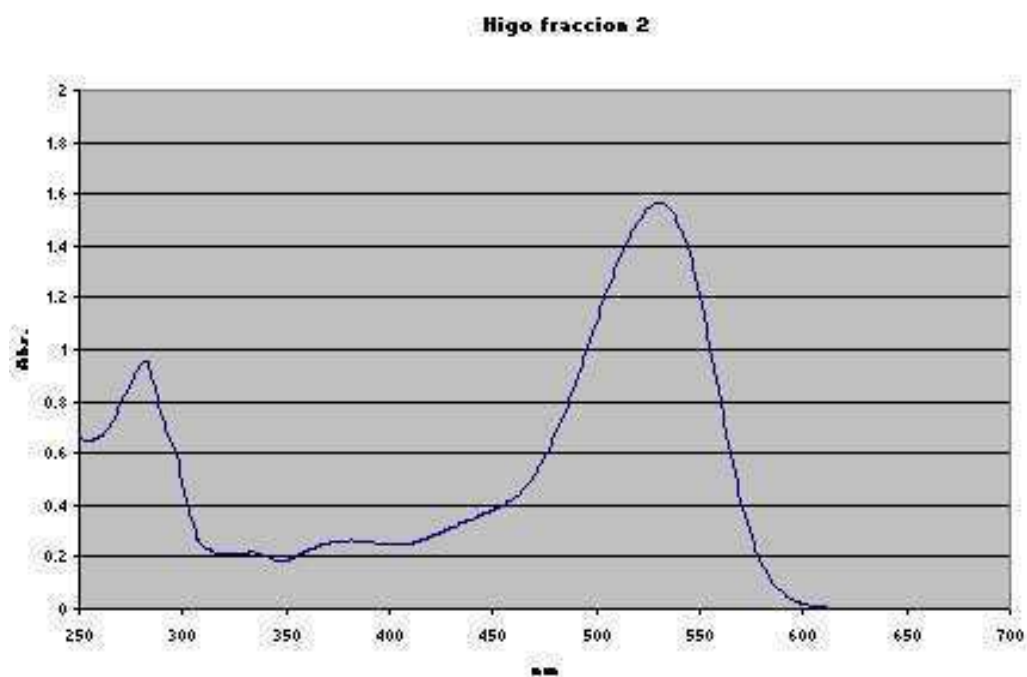


Figura N° 38: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 2 de *Ficus carica* L. (Tabla 7).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la cianidina.

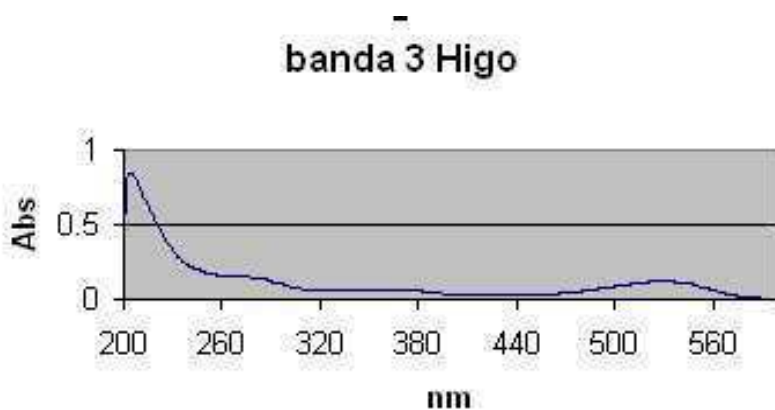


Figura N°39: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 3 de *Ficus carica* L. (Tabla 7).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la cianidina

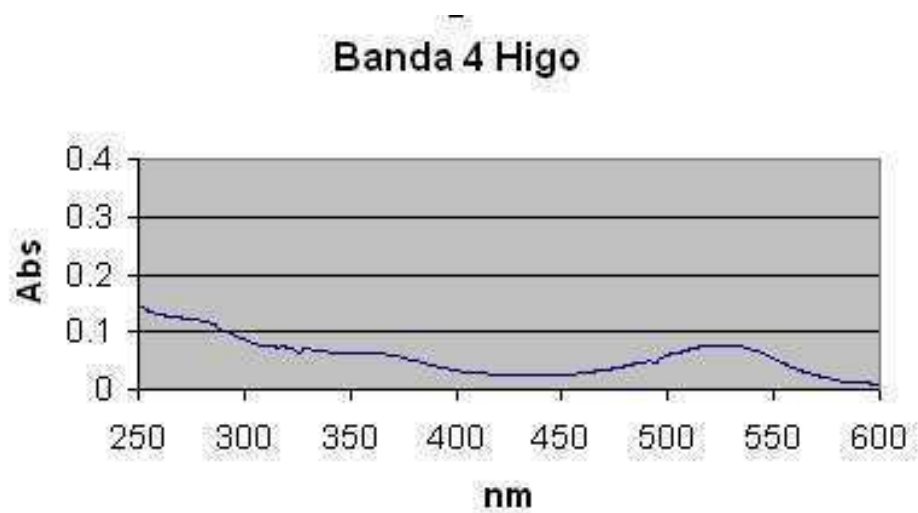


Figura N° 40: Espectro UV-visible de la banda 4 de *Ficus carica* L. (Tabla 7).
No presenta el E440/Emax característico de una antocianina conocida.

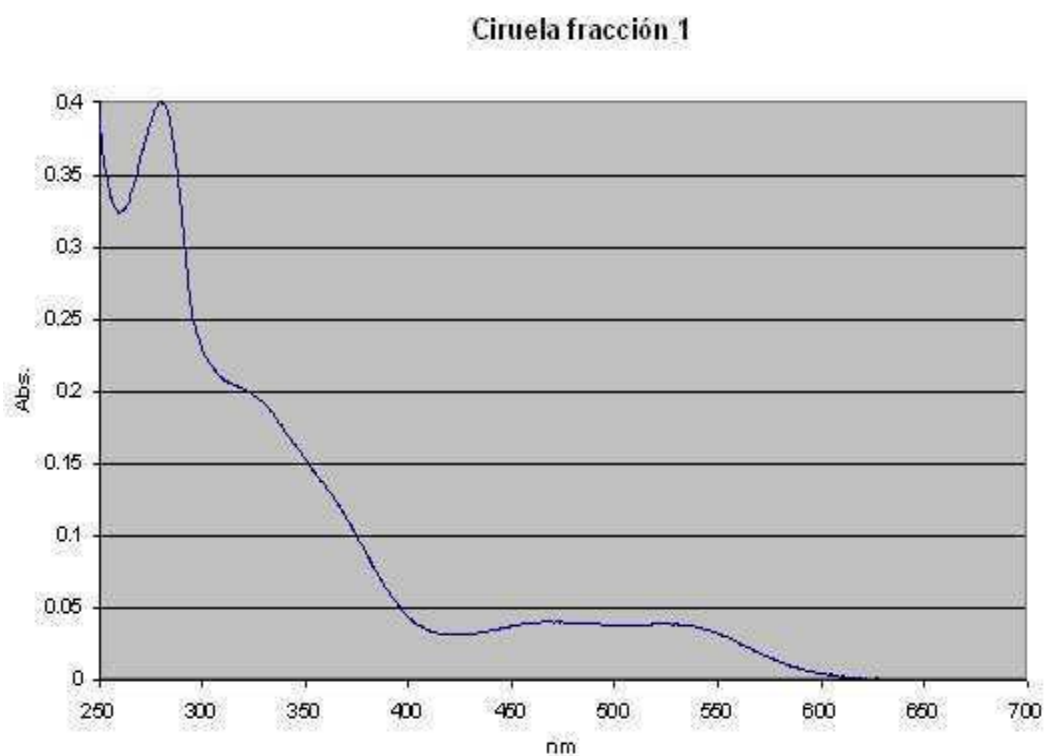


Figura N° 41: Espectro UV-visible de la banda 1 de *Prunus domestica* L. (Tabla 8).

No presenta el E440/Emax característico de una antocianina conocida.

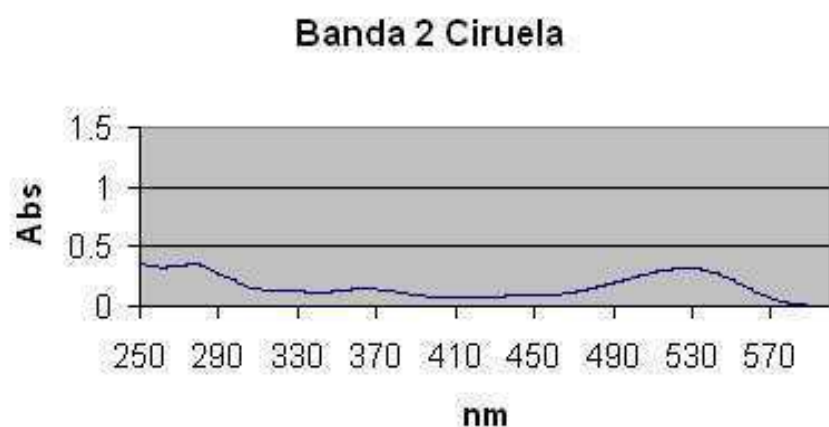


Figura N° 42: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 2 de *Prunus domestica* L. (Tabla 8).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la peonidina.

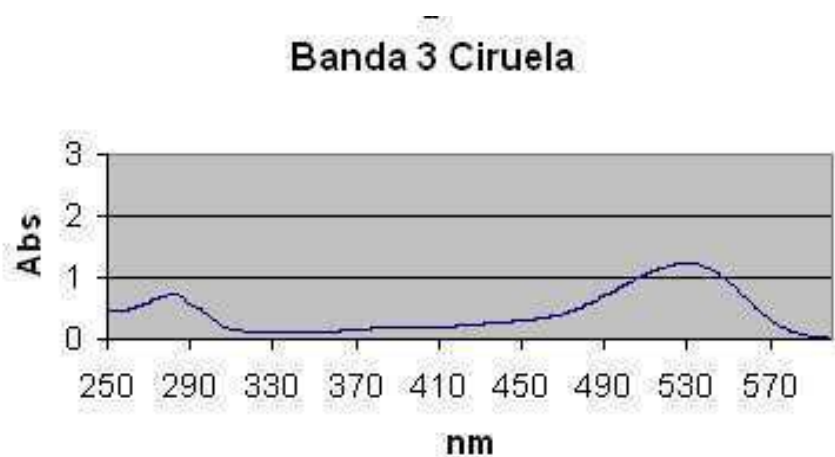


Figura N° 43: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 3 de *Prunus domestica* L. (Tabla 8).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la cianidina.

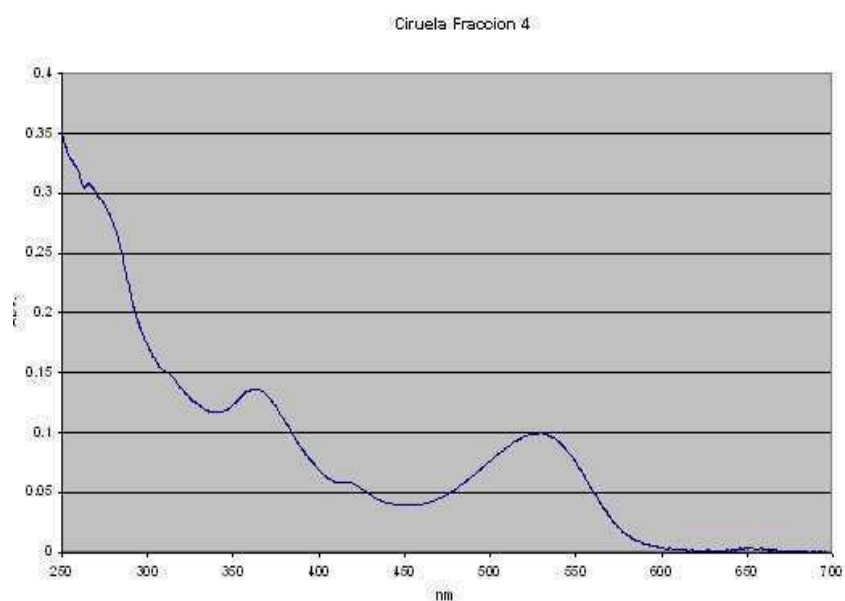


Figura N° 44: Espectro UV-visible de la banda 4 de *Prunus domestica* L. (Tabla 8).

No presenta el E440/Emax característico de una antocianina conocida.

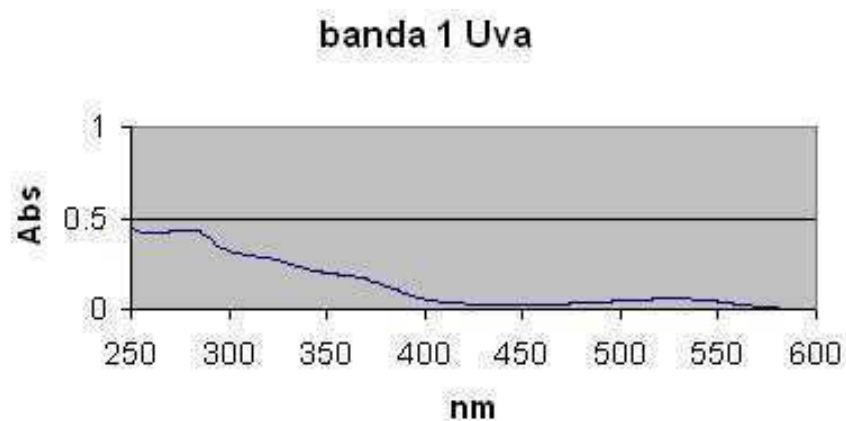


Figura N° 45: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 1 de *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe” (Tabla 9).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la peonidina.

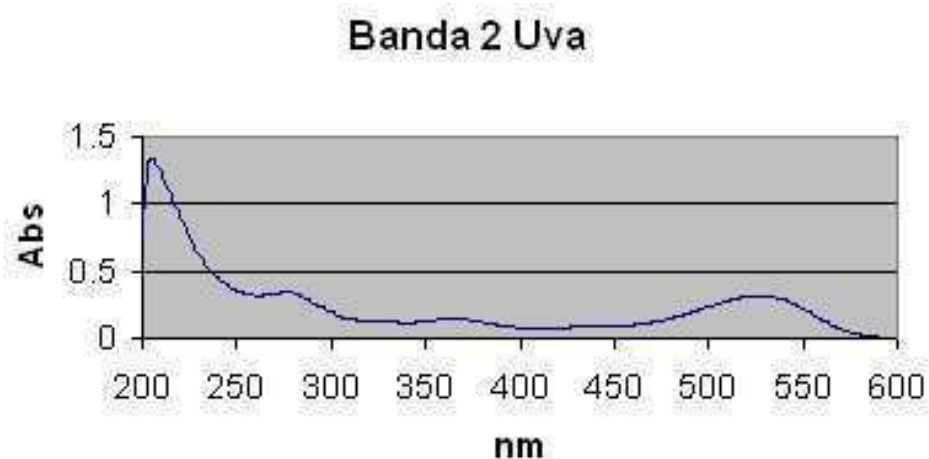


Figura N° 46: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 2 de *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe” (Tabla 9).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la cianidina.

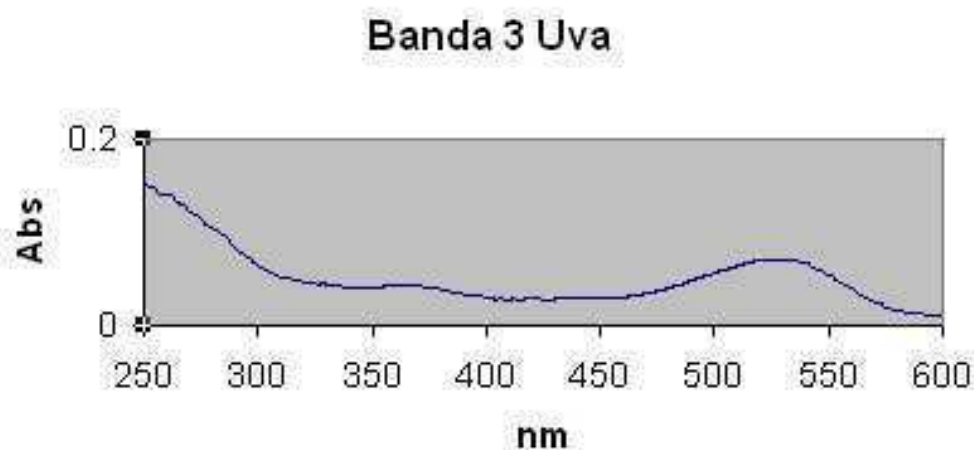


Figura N° 47: Espectro UV-visible de la antocianina de la banda 3 de *Vitis vinifera* L c.v. “Red Globe” (Tabla 9).

Presenta un pico de absorción característico de una antocianina, posiblemente la malvidina.